

Донецький національний університет імені Василя Стуса МОН України  
Донецький національний медичний університет МОЗ України  
Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Федотов Олег Валерійович**

УДК 582.287:547.92

## **ДИСЕРТАЦІЯ**

**Біотехнологічні засади регулювання і використання прооксидантно-  
антиоксидантної активності базидієвих грибів**

Подається на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело:

\_\_\_\_\_ О.В. Федотов

Науковий консультант: **Бісько Ніна Анатоліївна**, доктор біологічних  
наук, старший науковий співробітник.

**Київ – 2017**

## АНОТАЦІЯ

*Федотов О.В.* Біотехнологічні засади регулювання і використання прооксидантно-антиоксидантної активності базидієвих грибів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Донецький національний університет імені Василя Стуса МОН України. – Донецький національний медичний університет МОЗ України. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, Київ, 2017.

Базидієві гриби є джерелом різноманітних природних біологічно активних речовин з широким спектром практичного застосування. Їх використовують в якості дієтичного харчування, харчових добавок, грибних лікарських препаратів, біопрепаратів для захисту рослин і космоцевтиків тощо. Актуальність вивчення базидієвих грибів обумовлена встановленням їх корисних властивостей, пошуком нових хімічних сполук, вивченням закономірностей і спрямованої регуляції метаболічних шляхів біологічно активних речовин, визначенням біологічної ролі активних метаболітів, зокрема у пристосуванні до різноманітних субстратів та у адаптогенних реакціях і, нарешті, широким застосуванням в біотехнології, екології та господарстві. Як наслідок, розробка нових інтенсивних біотехнологій культивування різних видів базидієвих грибів з метою отримання як міцелію, так і біологічно активних сполук з кожним роком стає все більш актуальною.

Створення нових біотехнологій вимагає глибокого вивчення факторів, що регулюють біосинтетичні функції клітин гриба та максимально розкривають їх потенціал. Адаптаційні перебудови полягають у зміні балансу прооксидантно-антиоксидантної системи: активації процесів перекисного окислення ліпідів і ферментних систем, утворення прооксидантно-антиоксидантних речовин, здатних активно реагувати на дії певних факторів. До функціонально лабільних антиоксидантних речовин, зокрема, відносяться

оксидоредуктази, поліфеноли, пігменти і інші.

Ксилотрофні базидієві гриби здатні утворювати високоактивні кисневі радикали, які беруть участь у деструкції високомолекулярних речовин, в першу чергу фенольних сполук, лігніну, целюлози тощо. Передбачається, що вивчення механізмів такої деструкції може відкрити шляхи до розробки екологічно чистих енергозберігаючих біотехнологій біодеструкції та біоутилізації хімічно стійких відходів промисловості та переробки лігноцелюлозної сировини. Велике значення в процесі деградації лігніну ксилотрофами відіграють реакції вільно-радикального окислювання, а також синтез цими грибами різних речовин окисно-відновної дії і біоантиоксидантів. Разом з цим, вивчаються взаємозв'язок між пігментацією і утворенням вторинних метаболітів, антиоксидантна і гензахисна властивості грибних пігментів – каротиноїдів і меланіну.

Детальні дослідження лікарських грибів (*medicinal mushrooms*) показують, що їх фізіологічна дія значною мірою може бути обумовлена наявністю в їх складі антиоксидантних сполук та збалансованістю у системі прооксиданти-антиоксиданти. Проте, дані щодо прооксидантно-антиоксидантної активності базидієвих грибів уривчасті і поодинокі, бракує систематичних досліджень антиоксидантних властивостей біологічно активних сполук цих грибів. Щойно розпочаті дослідження стосовно використання базидієвих грибів у мікотестуванні та біоремедіації довкілля.

Дослідження та наукові розробки за темою дисертації є складовою частиною тематики кафедри фізіології та біохімії рослин Донецького національного університету імені Василя Стуса МОН України та кафедри медичної біології, мікробіології, вірусології та імунології Донецького національного медичного університету МОЗ України: «Вивчення механізмів розвитку і біопродуктивності базидіальних грибів і на їх основі розроблення технології одержання ферментних препаратів, біопрепаратів і харчових продуктів» (Державний реєстраційний № 0100U001964); «Вивчення біопродуктивності базидіоміцетів і розроблення біотехнології одержання

біопрепаратів та харчових продуктів» (Державний реєстраційний № 0103U003363); «Індукція протеїназ і селекція вищих базидіоміцетів для одержання біопрепаратів та харчових продуктів» (Державний реєстраційний № 0106U001946); «Розробка засобів біоіндикації екологічного стану Донбасу» (Державний реєстраційний № 0105U002768); «Діагностика екологічного стану середовища індустріального регіону за допомогою розробленої технології комплексної біоіндикації» (Державний реєстраційний № 0108U001589); «Визначення порогів чутливості біоіндикаторів на дію екологічно несприятливих факторів середовища» (Державний реєстраційний № 0110U003462); «Одержання ферментних препаратів, підвищення продуктивності базидіоміцетів за культивування на відходах в лабораторних та напівпромислових умовах» (Державний реєстраційний № 0115U000090).

У дисертації вперше одержані такі наукові результати:

- Комплексно вивчено та кількісно охарактеризовано прооксидантно-антиоксидантну систему 58 штамів 13 видів 9 родин відділу *Basidiomycota*. На основі отриманих даних простежено взаємозв'язок показників накопичення біомаси, перекисного окислення ліпідів та прооксидантної, антиоксидантної, оксидоредуктазної активностей в процесі культивування штамів базидієвих грибів в умовах періодичної поверхневої культури.
- Виявлено чинники культивування, які відкривають можливість регуляції синтезу прооксидантно-антиоксидантних речовин, активності ферментів і інтенсивності процесів перекисного окислення ліпідів. Розроблено науково обґрунтовані методичні підходи інтенсифікації біотехнології культивування біосинтетично активних штамів, що мають переваги перед відомими.
- Шляхом модифікації схеми біотехнологічного процесу, удосконалення складу живильного середовища і методів виділення, експериментально одержано нові екстра- і інтрацелюлярні грибні ферментні препарати каталаз і пероксидаз. Вперше досліджено їх основні фізико-біохімічні характеристики, визначено вміст білку і кількісний амінокислотний склад.

– Встановлено вміст поліфенолів та пігментів – каротиноїдів і меланінів в культурах штамів базидієвих грибів. На основі отриманих даних виявлені штами – перспективні продуценти поліфенолів, каротиноїдів та меланінів.

– Розроблені та перевірені в напівпромислових умовах науково обґрунтовані способи регулювання прооксидантно-антиоксидантної активності базидієвих грибів при культивуванні штамів-продуцентів біологічно активних речовин та біодеструкції полютантів.

На підставі результатів експериментальних досліджень створено наукові засади біотехнологічного використання прооксидантно-антиоксидантних властивостей базидієвих грибів. Інтродуковано в культуру 58 штамів, що належать до 13 видів 9 родин порядку *Polyporales* та *Agaricales* базидієвих грибів (відділ *Basidiomycota*). Штами депоновано у Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК), що має статус Національного надбання України. Розроблені нові живильні середовища для культивування штамів базидієвих грибів, що забезпечують підвищення біосинтетичних можливостей штамів. Запропоновані модифіковані технології, що дозволили виділити нові грибні ферментні препарати каталаз і пероксидаз. Отримані нові дані з кількісного амінокислотного складу ферментних препаратів та їх біохімічних характеристик; вмісту поліфенолів і пігментів та динаміки синтезу каротиноїдів.

Нові технологічні рішення культивування штамів базидієвих грибів з підвищеним вмістом прооксидантно-антиоксидантних речовин по відношенню до традиційних джерел цих речовин та використання грибних ферментних препаратів апробовано та впроваджено на Донецькому міському молочному заводі № 2, ТОВ «УкрМіцелій», ТОВ «Біотехнологія», Інституті хімічних технологій СХУ ім. В. Даля (м. Рубіжне).

Наукові і науково-практичні результати дисертаційної роботи використано в навчальному процесі на біологічному факультеті Донецького національного університету імені Василя Стуса.

Ці практичні результати є науково обґрунованим підґрунтям до широкого залучення нових об'єктів біотехнології до процесів отримання затребуваних біологічно активних речовин та способів біоконверсії і біоутилізації відходів.

Робота є результатом самостійних досліджень О.В. Федотова.

Автором особисто обрано напрям досліджень, розроблено концепцію роботи, здійснено пошук та аналіз літературних даних, розроблено робочі гіпотези та обґрунтована методологія постановки експериментів. Здійснено експедиційні виїзди з метою збору мікологічного матеріалу, аналіз видового складу та виділення чистих культур базидіомікозових, проведені дослідження та статистична обробка результатів. Окремі розділи експериментальної роботи виконувались за участю співробітників, аспірантів і студентів біологічного факультету ДонНУ під керівництвом автора, що знайшло відображення у співавторстві в публікаціях і патентах. Здобувачем проаналізовано і узагальнено результати досліджень, сформульовано висновки, оформлено їх в вигляді публікацій. Обговорення результатів та висновків проведено здобувачем у творчому співробітництві з науковим консультантом.

Основні положення та результати дисертаційної роботи опубліковано у 60 працях, серед яких: 36 наукових фахових статей (у т.ч. 2 статті у виданнях іноземних країн, 15 статей у вітчизняних журналах, які представлено у міжнародних наукометричних базах даних), 7 статей у інших наукових виданнях України, 9 тез доповідей, 7 патентів України на корисні моделі і 1 деклараційний патент України.

**Ключові слова:** біотехнологія, перекисне окислення ліпідів, антиоксиданти, оксидоредуктази, пігменти, *Basidiomycota*.

## ANNOTATION

Fedotov Oleg Valeryevich. Biotechnological bases of regulation and use of prooxidant-antioxidant activity of Basidiomycetes. – Qualification scientific work as a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Biological Science in the specialty 03.00.20 – Biotechnology. – Vasyl' Stus Donetsk National University the Ministry of Education and Science of Ukraine. – Donetsk National Medical University the Ministry of Health of Ukraine. – The National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute» the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2017.

Basidiomycetes are a source of a variety of natural biologically active substances with a wide range of practical applications. They are used as dietary foods, nutritional supplements, fungal drugs, biological products for the protection of plants and cosmetology, etc. Actuality of the study of Basidiomycetes is due to the establishment of their useful properties, search for new chemical compounds, study of regularities and directed regulation of metabolic pathways of biologically active substances, determination of the biological role of active metabolites, in particular adapting to different substrates and in adaptogenic reactions, and finally, wide application in biotechnology, ecology and agriculture. As a result, the development of new intensive biotechnologies for the cultivation of various types of Basidiomycetes in order to obtain both mycelium and biologically active compounds is becoming more relevant every year.

Creation of new biotechnology requires a highly study of factors that regulate the biosynthetic functions of fungal cells and as much as possible reveal their potential. Adaptation adjustments consist in changing the balance of the prooxidant antioxidant system: activation of lipid peroxidation processes and enzyme systems, formation of prooxidant-antioxidant substances, able to actively respond to the actions of certain factors. Functionally labile antioxidant substances include oxidoreductase, polyphenols, pigments, and others.

Xylotrophic basidiomycetes are able to form highly active oxygen radicals,

that take part in the destruction of high molecular substances, first of all phenolic compounds, lignin, cellulose etc. It is assumed, that the study of the mechanisms of such destruction may discover the way for the development of environmentally friendly energy-saving biotechnology of biodestruction and bio utilization of chemically resistant waste of industry and recycling of ligno-cellulose raw materials. The most important in the process of degradation of lignin xylotrophs play the reactions of free radical oxidation, also the synthesis by these fungi of different substances of redox action and bioactive antioxidants. At the same time, the relationship between pigmentation and the formation of secondary metabolites, antioxidant and gene protective properties of fungus pigments - carotenoids and melanin are studied.

Detailed research of medicinal fungus (*medicinal mushrooms*) show that their physiological action may be due to the presence in their composition of antioxidant compounds and the balance in the system of antioxidant antioxidants. However, data of the prooxidant-antioxidant activity of basidiomycetes are fragmentary and single, there is a lack of systematic research of antioxidant properties of biologically active compounds of these fungi. Recently, research has begun on the use of basidium fungi in the myco-test and bioremediation of the environment.

Researches and scientific developments on the theme of the dissertation are an integral part of the topics of the Department of physiology and biochemistry of plant of Vasyl' Stus Donetsk National University Donetsk and the Department of medical biology, microbiology, virology and immunology of the Donetsk National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine: "The Study of developing the mechanisms and bioproductivity of basidiomycetes and working out the technologies of obtaining enzyme preparations, biopreparations and food products" (State registration number 0100U001964); "The Study of bioproductivity basidiomycetes and working out the biotechnology of obtaining biopreparations and food products" (State registration number № 0103U003363); "Induction of proteinases and selection of higher basidiomycetes for obtaining



biopreparations and food products” (State registration number № 0106U001946); “The working out methods of Donbas ecological conditions bioindication” (State registration number № 0105U002768); “The diagnosis of industrial region environment ecological conditions with the help of the developed technology of complex bioindication” (State registration number № 0108U001589); “The finding of bioindications ranges of sensitivity to unfavorable ecological factors of environment” (State registration number № 0110U003462); “Obtaining enzyme preparations, raising the productivity of basidiomycetes by cultivation with the use of waste materials in laboratory and semi-industrial conditions” (State registration number 0115U000090).

The following scientific results were obtained for the first time in the dissertation:

- The prooxidant-antioxidant system of 58 strains of 13 species of 9 families of the Basidiomycetes has been comprehensively studied and quantified. On the basis of the obtained data, the correlation between the indices of biomass accumulation, lipid peroxidation and prooxidant, antioxidant, oxidoreductase activity in the process of cultivating the strains of basidium fungi in the conditions of periodic surface culture was traced.
- Cultivation factors are discovered that permit the possibility of regulation the synthesis of prooxidant antioxidant substances, enzyme activity and the intensity of lipid peroxidation processes. Scientifically grounded methodical approaches for the intensification of biotechnology for the cultivation biosynthesisally active strains, that have advantages over the known ones, have been developed.
- By modification the scheme of the biotechnological process, improvement of composition of nutrient medium and methods of selection, new extra- and intracellular fungal enzyme preparations of catalase and peroxidase have been experimentally obtained. For the first time their basic physico-biochemical characteristics have been investigated, the protein content and the quantitative amino acid composition are determined.

- Content of polyphenols and pigments - carotenoids and melanins in cultures of strains of basidium fungi is established. On the basis of the data strains - promising producers of polyphenols, carotenoids and melanins - were obtained.
- Scientifically grounded methods of regulation the prooxidant-antioxidant activity of basidium fungi in the cultivation of strains producing biologically active substances and biodegradation of pollutants were developed and tested in semi-industrial conditions.

In accordance with the results of experimental studies the scientific principles of biotechnological use of prooxidant-antioxidant properties of basidium fungi have been created. The culture of 58 strains, belonging to 13 species of 9 families of Polyporales and Agaricales of Basidiomycetes (Basidiomycota Division), was introduced. The strains were taken from the Collection of cultures of Mushrooms by M.G. Kholodny Institute of botany, NAS of Ukraine that has the status of the National heritage of Ukraine. New nutrient environments for the cultivation of strains of basidium fungi, that provide increase of biosynthetic possibilities of strains were developed. Modified technologies that allowed to isolate of new fungal enzymes of catalase and peroxidase have been proposed. New data on the quantitative amino acid composition of enzyme preparations and their biochemical characteristics; content of polyphenols and pigments and dynamics of carotenoid synthesis were obtained. New technological solutions for the cultivation of basidium fungal strains with high content of prooxidant antioxidant substances in relation to traditional sources of these substances and the use of fungal enzyme preparations have been tested and carried out at Donetsk milk factory No. 2, JSC «UkrMicelij», JSC "Biotechnology", V. Dahl Institute of Chemical Technologies, (Rubizhne).

The scientific and scientific-practical results of the dissertation work were used in the educational process at the biological faculty of the Donetsk national university.

These practical results are scientifically grounded basis for the wide involvement of new biotechnology objects in the processes of obtaining the

required biologically active substances and methods of bioconversion and waste, bioutilization.

The work is the result of independent studies O.V. Fedotov.

The author personally chose the direction of research, developed the concept of work, carried out the search and analysis of literary data, developed working hypotheses and substantiated the methodology of staging experiments. Expeditionary departures to collect mycological material, analysis of species composition and isolation of pure cultures of basidiomycetes, research and statistical processing of the results were carried out. Separate sections of the experimental work were performed with the participation of the staff, post-graduate students and students of the biological faculty of DonNU under the direction of the author, that was reflected in co-authorship in publications and patents. The author has analyzed and summarized the research results, formulated the conclusions, prepared them in the publications. The discussion of the results and conclusions was carried out by the author in creative collaboration with the scientific consultant.

The main provisions and results of the dissertation work are published in 60 works: 36 scientific articles (including 2 articles in foreign countries, 15 articles in ukrainian journals, presented in international science-computer databases), 7 articles in other scientific editions of Ukraine, 9 theses of reports, 8 patents of Ukraine for utility models.

**Keywords:** Biotechnology, lipid peroxidation, antioxidants, oxidoreductase, pigments, *Basidiomycota*.

## Список публікацій здобувача за темою дисертації

### Статті у наукових фахових виданнях України

1. Федотов О.В. Стан прооксидантно-антиоксидантної системи деяких штамів базидіомікотових грибів / О.В. Федотов // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина. – 2017. – 8(1). – С. 77-84.
2. Федотов О.В. Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів штамів грибів порядків *Agaricales* і *Polyporales* / О.В. Федотов // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія. – 2016. – 24(2). – С. 314-323.
3. Велигодська А.К. Отримання та аналіз препаратів каротиноїдів деяких штамів ксилотрофних базидіоміцетів / А.К. Велигодська, О.В. Федотов // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія. – 2016. – 24(2). – С. 290-294.
4. Чайка О.В. Оцінка екологічного стану довкілля з використанням прооксидантно-антиоксидантної активності культур базидіоміцетів / О.В. Чайка, О.В. Федотов // Біоресурси і природокористування. – 2014. – 6(1-2). – С. 5-11.
5. Fedotov O.V. Search producers of polyphenols and some pigments among *Basidiomycetes* / O.V. Fedotov, A.K. Velygodska // Biotechnologia Acta. – 2014. – 7(1). – P. 110-116.
6. Чайка О.В. Ефективність біодеградації ксенобіотику *Methyl orange* культурами ксилотрофів у залежності від концентрацій пептону та глюкози / О.В. Чайка, О.В. Федотов // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2013, – 1(13). – С. 221-227.
7. Велигодська А.К. Вміст меланінів у базидіальних грибів порядків *Polyporales* та *Agaricales* / А.К. Велигодська, О.В. Федотов // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – 3(23). – С. 72-83.
8. Biotechnological aspects of xylophilic basidiomycetes culture fluid

- interfacial tensiometry and rheometry / A.V. Chaika, O.V. Fedotov, V.B. Fainerman, S.V. Lylyk // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – 6(6). – P. 120-131.
9. Voloshko T.E. Active producers of peroxidase Basidiomycetes strains screening / T.E. Voloshko, O.V. Fedotov // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – 6(5). – P. 137-142.
  10. Voloshko T.E. Comparative characteristics of basidiomycetes – producers of catalase / T.E. Voloshko, O.V. Fedotov // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – 6(3). – P. 89-94.
  11. Волошко Т.Є. Вплив деяких мікроелементів на активність оксидоредуктаз базидіоміцетів / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // *Мікробіологія і біотехнологія*. – 2013. – 1(21). – С. 63-80.
  12. Велигодська А.К. Порівняльна характеристика загального вмісту каротиноїдів у деяких видів базидіальних грибів / А.К. Велигодська, О.В. Федотов // *Мікробіологія і біотехнологія*. – 2012. – 4(20). – С. 84-101.
  13. Федотов О.В. Загальний вміст поліфенольних речовин у деяких видів базидіоміцетів / О.В. Федотов, А.К. Велигодська // *Мікробіологія і біотехнологія*. – 2012. – 3(19). – С. 44-55.
  14. Федотов О.В. Вплив бензопірену на інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів штаму *Pleurotus ostreatus* P-107 / О.В. Федотов, О.В. Чайка, О.Г. Метрусенко // *Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону*. – 2012. – 1(12). – С. 252-258.
  15. Федотов О.В. Колекція культур шапинкових грибів – основа мікологічних досліджень та стратегії збереження біорізноманіття базидіоміцетів / [О.В. Федотов, О.В. Чайка, Т.Є. Волошко, А.К. Велигодська] // *Вісник Донецького університету, Сер. А: Природничі науки*. – 2012. – 1. – С. 209–213.
  16. Федотов О.В. Фізико-хімічні показники мікологічних об'єктів у біоіндикації довкілля / О.В. Федотов // *Проблеми екології та охорони*

- природи техногенного регіону. – 2011. – 1(11). – С. 261-265.
17. Волошко Т.Є. Скринінг штамів базидіоміцетів за активністю антиоксидантних оксидоредуктаз / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // Мікробіологія і біотехнологія. – 2011. – 4(16). – С. 69-84.
  18. Чайка О.В. Ріст та інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів штаму *Pleurotus ostreatus* P-107 / О.В. Чайка, О.В. Федотов // Мікробіологія і біотехнологія. – 2011. – 3(15). – С. 88-96.
  19. Федотов О.В. Мікотестування забруднення навколишнього середовища фенолом / О.В. Федотов, М.С. Перцевой // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2010. – 1(10). – С. 208-214.
  20. Чайка О.В. Порівняльна характеристика динаміки перекисного окиснення ліпідів штамів їстівних лікарських грибів *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. та *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing. / О.В. Чайка, О.В. Федотов // Вісник Донецького національного університету. Сер. А: Природничі науки. – 2010. – 1. – С. 241-245.
  21. Федотов О.В. Вплив джерел вуглецевого живлення на ріст і каталазну активність штаму P-6v *Pleurotus ostreatus* / О.В. Федотов, О.М. Брусніцина // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2008. – 1(8). – С. 248-253.
  22. Федотов О.В. Вплив нікотинової кислоти на пероксидазну активність штамів їстівних лікарських базидіоміцетів *Pleurotus ostreatus* та *Lentinula edodes* / О.В. Федотов, Т.Є. Волошко // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2008. – 1(8). – С. 253-256.
  23. Федотов О.В. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів в лікарських базидіоміцетах національного природного парку «Святі гори» / О.В. Федотов // Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія. – 2005. – 260. – С. 254-259.
  24. Федотов О.В. Активність пероксидаз їстівних лікарських базидіоміцетів у залежності від температури культивування та місцезростання / О.В. Федотов // Проблеми екології та охорони природи техногенного

регіону. – 2004. – 4. – С. 183-188.

25. Федотов О.В. Динаміка росту та вмісту продуктів перекисного окислювання ліпідів в культурах *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm. / О.В. Федотов, О.А. Крюков // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Сер. «Біологічні науки». – 2003. – 32(44). – С. 22-25.
26. Федотов О.В. Динаміка росту та каталазної активності штамів *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. з різних екологічних місць зростання / О.В. Федотов // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2003. – 3. – С. 194-198.
27. Федотов О.В. динаміка активності пероксидази та ростових показників штаму F-vv *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. / О.В. Федотов, Ю.В. Горяшник // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Сер. «Біологічні науки». – 2003. – 25(37). – С. 42-44.
28. Федотов О.В. Ріст та каталазна активність штамів грибів роду *Pleurotus* (Fr.) Kumm. / О.В. Федотов, Г.В. Гавриленко // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Сер. «Біологічні науки». – 2003. – 22(34). – С. 82-84.
29. Федотов О.В. Вміст продуктів перекисного окислювання ліпідів в міцелії грибів родів *Pleurotus* (Fr.) Kumm. та *Lentinus* (Berk.) Sing. / О.В. Федотов // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Сер. «Біологічні науки». – 2003. – 22(34). – С. 79-81.
30. Федотов О.В. Антиокисна активність міцелію штамів грибів родів *Pleurotus* (Fr.) Kumm. і *Flammulina* (Curt.: Fr.) Sing. / О.В. Федотов // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Сер. «Біологічні науки». – 2002. – 16(28). – С. 63-66.
31. Гавриленко Г.В. Зміна каталазної активності культур *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. під час культивування / Г.В. Гавриленко,

О.В. Федотов // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Сер. «Біологічні науки». – 2002. – 15(27). – С. 52-54.

32. Федотов О.В. Біоконверсія лушпиння соняшника дереворуйнівним сапрофітним грибом *Hirschioporus laricinus* (Karst.) Ryv. / О.В. Федотов, С.Ф. Негруцький // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2002. – 2. – С. 186-190.
33. Федотов О.В. Зв'язані амінокислоти і білок ферментних препаратів молокозсідальної дії у афілофорових грибів / О.В. Федотов, М.І. Бойко, С.Ф. Негруцький // Український ботанічний журнал. – 2002. – 59(1). – С. 45-48.
34. Федотов О.В. Молокозсідальна і антиокисна активність ферментних препаратів штамів афілофорових грибів / О.В. Федотов // Збірник наукових праць Луганського державного аграрного університету. Сер. «Біологічні науки». – 2001. – 9(21). – С. 136-141.

Статті у наукових фахових виданнях інших країн

35. Fedotov O.V. Milk-clotting and antioxidant activity of enzyme preparations of fungi strains of the order Polyporales s.l. / O.V. Fedotov, A.K. Velygodska // The scientific heritage. Biological Sciences. – 2016. – V.1. – 2(2). – P. 71-76. (Угорщина)
36. Fedotov O.V. Antioxidizing activity of mycelium of mushroom stocks *Pleurotus* (Fr.) Kumm. and *Flammulina* (Curt.: Fr.) Sing. / O.V. Fedotov // International journal of medicinal mushrooms. – 2001. – 3(2-3). – P. 143-144. (Міжнародний науковий фаховий журнал)

Статті в інших наукових виданнях

37. Федотов О.В. Загальна антиоксидантна активність деяких штамів базидіальних грибів в динаміці росту / О.В. Федотов // Біологічний вісник Мелітопольського державного педагогічного університету ім. Богдана Хмельницького. – 2016. – 2(6). – С. 158-165.
38. Велигодська А.К. Скринінг вмісту та динаміка накопичення



- поліфенольних речовин у деяких видів базидіоміцетів / А.К. Велигодська, О.В. Федотов // Біологічний вісник Мелітопольського державного педагогічного університету ім. Богдана Хмельницького. – 2015. – 5(3). – С. 43-54.
39. Федотов О.В. Розробка способів отримання і аналіз ферментних препаратів пероксидаз та каталаз деяких видів базидіоміцетів / О.В. Федотов, Т.Є. Волошко // Біологічний вісник Мелітопольського державного педагогічного університету ім. Богдана Хмельницького. – 2013. – 1(7). – С. 113-127.
40. Соломко Е.Ф. Вплив хімічних речовин на інтенсивність перекисного окислення ліпідів грибів *Flammulina velutipes* (Curt. ex fr.) Sing. та *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. / Е.Ф. Соломко, О.В. Федотов, О.В. Чайка // Природа Західного Полісся та прилеглих територій. – 2010. – 7. – С. 146-149.
41. Федотов О.В. Активність ПОЛ і каталази макроміцетів – як можливі біоіндикаційні показники екологічного стану їх місця зростання / О.В. Федотов, А.М. Євсєєнкова, М.С. Перцевой // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Сер. «Сільськогосподарські науки». – 2008. – 82. – С. 73-81.
42. Федотов О.В. Амінокислотний склад ферментних препаратів пероксидаз істівних лікарських грибів *Lentinus edodes*, *Flammulina velutipes* і *Pleurotus ostreatus* / О.В. Федотов // Вісник Донецького університету. Сер. А: Природничі науки. – 2006. – 2. – С. 270-274.
43. Федотов О.В. Амінокислотний склад ферментних препаратів каталази істівних лікарських грибів *Flammulina velutipes* і *Pleurotus ostreatus* / О.В. Федотов // Вісник Донецького університету. Сер. А: Природничі науки. – 2005. – 2. – С. 247-250.

#### Патенти

44. Патент на корисну модель 110849 Україна, МПК А01G1/04(2006.01).  
Спосіб біоконверсії лігноцелюлозних відходів переробки олійних

- культур з використанням дереворуйнівного базидіоміцету *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill / О.В. Федотов, А.К. Велигодська. № u201603509, заявл. 04.04.2016, опубл. 25.10.2016, Бюл. № 20.
45. Патент на корисну модель 91411 Україна, МПК C12N1/14(2006.01), A01G1/04(2006.01). Спосіб одержання ферментного препарату каталази штаму *Pleurotus ostreatus* P-208 / О.В. Федотов, Т.Є. Волошко. № u201310997, заявл. 16.09.2013, опубл. 10.07.2014, Бюл. № 13.
46. Патент на корисну модель 91413 Україна, МПК C12N1/14(2006.01), A01G1/04(2006.01). Спосіб одержання ферментного препарату пероксидази штаму *Agrocybe cylindracea* 167 / О.В. Федотов, Т.Є. Волошко. № u201311000, заявл. 16.09.2013, опубл. 10.07.2014, Бюл. № 13.
47. Патент на корисну модель 38623 Україна, МПК (2009), A01H15/00, C12N1/14. Спосіб індукції пероксидазної активності базидіоміцетів *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. та *Lentinula edodes* (Berk.) Sing. аскорбіновою кислотою / О.В. Федотов, Т.Є. Волошко. № u200809174, заявл. 14.07.2008, опубл. 12.01.2009, Бюл. № 1.
48. Патент на корисну модель 39027 Україна, МПК (2009), A01G7/00, A01H3/00. Спосіб індукції пероксидазної активності базидіоміцетів *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. та *Lentinula edodes* (Berk.) Sing. нікотиною кислотою / О.В. Федотов, Т.Є. Волошко. № u200809154, заявл. 14.07.2008, опубл. 26.01.2009, Бюл. № 2.
49. Патент на корисну модель 8739 Україна, МПК 7C12N9/58. Спосіб одержання ферментного препарату пероксидази *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. / О.В. Федотов, О.Ю. Кваско. № 200501510, заявл. 18.02.2005, опубл. 15.08.2005, Бюл. № 8.
50. Патент на корисну модель 8713 Україна, МПК 7C12N9/58, A61K38/00. Спосіб одержання ферментних препаратів каталази *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. і *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. / О.В. Федотов. № 200501341, заявл. 14.02.2005, опубл. 15.08.2005, Бюл. № 8.

51. Деклараційний патент на винахід 40900А Україна, МПК 7С12М1/04, С12М1/38. Лабораторна ферментаційна установка для культивування базидіоміцетів. / С.Ф. Негруцький, М.І. Бойко, О.В. Федотов, В.О. Полях. № 2000105818, заявл. 16.10.00, опубл. 15.08.2001, Бюл. № 7.

Тези доповідей на наукових конференціях

52. Федотов О.В. Інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів штамів базидієвих грибів. / О.В. Федотов // Актуальні питання розвитку біології та екології. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції. – Вінниця: ТОВ «Нілан-ЛТД». – 2016. – С. 294-297.
53. Регуляція росту та антиоксидантної активності культур базидіоміцетів вуглець- та азотовмісними речовинами / О.В. Чайка, Я.А. Зборовська, О.В. Федотов // Біотехнологія: звершення та надії. Матеріали II Всеукраїнської науково-практичної конференції. – К.: НУБіПУ, 2013. – С. 24-25.
54. Вплив джерел вуглецевого живлення на синтез поліфенольних речовин базидіоміцету *Fistulina hepatica* Fh-08/ А.К. Велигодська А.С. Петреєва, О.В. Федотов // Біотехнологія: звершення та надії. Матеріали II Всеукраїнської науково-практичної конференції. – К.: НУБіПУ, 2013. – С. 44-45.
55. Федотов О.В. Вплив рН живильного середовища на активність антиоксидантних оксидоредуктаз *Fistulina hepatica* / О.В. Федотов, Т.Є. Волошко // Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів. – К.: ІФРiГ НАНУ, 2012. – С. 233-234.
56. Волошко Т.Є. Вплив вітаміну В<sub>12</sub> на активність антиоксидантних оксидоредуктаз базидіоміцету *Flammulina velutipes* / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // Матеріали XIII з'їзду Українського ботанічного товариства. – Львів, 2011. – С. 419.
57. Fedotov O.V. Wood-destroying fungi as bio-sources of ferments for medicinal and nutritional purposes / O.V. Fedotov // Plant and Microbial

Enzymes: isolation, characterization and biotechnology applications. – Tbilisi: Myza, 2007. – P. 125-131.

58. Федотов О.В. Пероксидазная активность штаммов *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. / О.В. Федотов, Р.Б. Такташов // Микология и альгология – 2004. Материалы юбилейной конференции к 85-летию кафедры микологии и альгологии МГУ им. М.В. Ломоносова. – М.: Прометей МПГУ, 2004. – С. 130-131.
59. Fedotov O.V. Mycelia antioxidizing activity of the strains of genera *Pleurotus* (Fr). Kumm. and *Flammulina* (Curt.: Fr.) Sing. / O.V.Fedotov, Y.U. Bugrim // The success of medical Mycology. – Vol. 3. – M.: National Academy of Mycology, 2003. – P. 252-254.
60. Федотов О.В. Амінокислотний склад білків ферментних препаратів молокозсідальної дії з ксилотрофа *Irpex lacteus* Fr. / О.В. Федотов // Проблеми ботаніки і мікології на порозі третього тисячоліття. Матеріали Х з'їзду УБТ. – Київ-Полтава, 1997. – С. 109.

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ .....</b>	<b>26</b>
<b>ВСТУП .....</b>	<b>27</b>
<b>РОЗДІЛ 1. НАУКОВО-ПРАКТИЧНІ АСПЕКТИ РЕГУЛЮВАННЯ І ВИКОРИСТАННЯ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ БАЗИДІЄВИХ ГРИБІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ) .....</b>	<b>36</b>
1.1. Сучасний стан та перспективи використання культур базидієвих грибів у біотехнології .....	36
<i>1.1.1. Основні напрямки практичного використання базидієвих грибів у біотехнології .....</i>	<i>36</i>
<i>1.1.2. Особливості базидієвих грибів, як об'єктів культивування .....</i>	<i>53</i>
1.2. Природні антиоксиданти .....	58
<i>1.2.1. Класифікація та основні напрямки їх практичного використання .....</i>	<i>58</i>
<i>1.2.2. Антиоксиданти рослинного походження та стан дослідження антиоксидантних властивостей базидієвих грибів .....</i>	<i>64</i>
1.3. Біологічне значення та біотехнологічні аспекти процесів перекисного окислення ліпідів .....	75
1.4. Антиоксидантні оксидоредуктази .....	82
1.5. Антиоксидантні властивості пігментів – каротиноїдів та меланінів .....	87
<b>Висновки до розділу 1 .....</b>	<b>92</b>
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....</b>	<b>93</b>
2.1. Об'єкти і матеріали досліджень .....	93
2.2. Методи інтродукції базидієвих грибів у чисту культуру та перевірки їх генетичної неоднорідності .....	97
2.3. Умови культивування та методи дослідження росту	

	22
вегетативного міцелію штамів базидієвих грибів .....	98
2.3.1. <i>Склад живильних середовищ</i> .....	98
2.3.2. <i>Визначення ростових характеристик штамів</i> .....	100
2.4. Біохімічні методи дослідження .....	102
2.4.1. <i>Визначення кислотності розчинів</i> .....	102
2.4.2. <i>Визначення вмісту цукрів</i> .....	102
2.4.3. <i>Визначення ефективності знебарвлення</i> .....	103
2.5. Методи дослідження біосинтетичної активності базидієвих грибів .....	103
2.5.1. <i>Визначення показників процесів перекисного окиснення ліпідів</i> .....	103
2.5.2. <i>Визначення антиоксидантної активності</i> .....	105
2.5.3. <i>Розрахунок коефіцієнту рівноваги прооксидантно- антиоксидантної системи</i> .....	105
2.5.4. <i>Визначення загального вмісту поліфенолів</i> .....	106
2.5.5. <i>Визначення загального вмісту каротиноїдів</i> .....	106
2.5.6. <i>Визначення загального вмісту меланінів</i> .....	107
2.5.7. <i>Визначення вмісту водорозчинних білків та продуктивності синтезу білків</i> .....	107
2.5.8. <i>Визначення каталазної активності</i> .....	108
2.5.9. <i>Визначення пероксидазної активності</i> .....	108
2.6. Методи отримання та дослідження складу грибних ферментних препаратів .....	109
2.7. Математичні методи, статистична обробка експериментальних даних .....	111
2.7.1. <i>Математичні методи оптимізації складу живильних середовищ</i> .....	111
2.7.2. <i>Статистична обробка експериментальних даних</i> .....	113
<b>РОЗДІЛ 3. РОСТОВІ ПОКАЗНИКИ ДОСЛІДЖУВАНИХ ШТАМІВ БАЗИДІЄВИХ ГРИБІВ</b> .....	114

3.1. Накопичення біомаси штамами за стандартних умов культивування .....	114
<b>Висновки до розділу 3 .....</b>	<b>116</b>
<b>РОЗДІЛ 4. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ІНТЕНСИФІКАЦІЇ ПРОЦЕСІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ ШТАМІВ БАЗИДІЄВИХ ГРИБІВ .....</b>	<b>117</b>
4.1. Самочинна і індукована інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів штамів базидієвих грибів .....	118
4.2. Вплив хімічних речовин на інтенсивність та можливість регуляції процесів ПОЛ штамів базидієвих грибів .....	125
<b>Висновки до розділу 4 .....</b>	<b>127</b>
<b>РОЗДІЛ 5. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ РЕГУЛЯЦІЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ШТАМІВ ГРИБІВ ПОРЯДКІВ <i>AGARICALES</i> S.L. ТА <i>POLYPORALES</i> S.L. ....</b>	<b>129</b>
5.1. Загальна антиоксидантна активність міцеліальних культур базидієвих грибів .....	130
5.2. Вплив хімічних речовин та можливість регуляції антиоксидантної активності штамів базидієвих грибів .....	134
<b>Висновки до розділу 5 .....</b>	<b>136</b>
<b>РОЗДІЛ 6. СТАН ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ШТАМІВ БАЗИДІЄВИХ ГРИБІВ .....</b>	<b>137</b>
6.1. Прооксидантна активність .....	138
6.2. Резерв субстратів перекисного окислення .....	142
6.3. Коефіцієнт рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи .....	146
<b>Висновки до розділу 6 .....</b>	<b>150</b>
<b>РОЗДІЛ 7. ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА БАЗИДІЄВИХ ГРИБІВ – ПРОДУЦЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНИХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ .....</b>	<b>152</b>

	24
7.1. Каталази .....	152
7.1.1. Каталазна активність штамів базидієвих грибів .....	152
7.1.2. Оптимізація живильного середовища для культивування штамів-продуцентів каталази .....	157
7.1.3. Модифікація способів виділення та фізико-біохімічні властивості ферментних препаратів каталаз .....	172
7.2. Пероксидази .....	175
7.2.1. Пероксидазна активність штамів базидієвих грибів .....	175
7.2.2. Вплив окремих сполук на біосинтез пероксидаз біосинтетично активними штамами .....	180
7.2.3. Модифікація способів виділення та фізико-біохімічні властивості грибних ферментних препаратів пероксидаз .....	185
<b>Висновки до розділу 7 .....</b>	<b>191</b>
<b>РОЗДІЛ 8. БІОСИНТЕЗ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ РЕЧОВИН ТА ДЕЯКИХ ПІГМЕНТІВ БАЗИДІЄВИМИ ГРИБАМИ І ПЕРСПЕКТИВИ ЇХ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ ..</b>	
8.1. Загальний вміст поліфенольних речовин .....	195
8.2. Загальний вміст каротиноїдів .....	202
8.3. Загальний вміст меланінів .....	206
<b>Висновки до розділу 8 .....</b>	<b>210</b>
<b>РОЗДІЛ 9. РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ СПОСОБІВ ВИКОРИСТАННЯ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БАЗИДІЄВИХ ГРИБІВ .....</b>	
9.1. Антиоксидантна активність ферментних препаратів грибного походження .....	212
9.2. Розробка способу біоіндикації стану довкілля з використанням показників прооксидантно-антиоксидантної системи базидієвих грибів .....	215
9.3. Розробка способу біоконверсії лігноцелюлозних відходів з використанням базидієвих грибів –	



	25
продуцентів каротиноїдів .....	222
9.4. Розробка способу біодеструкції органічних сполук, що утворюються при окисленні аніліну з використанням базидієвих грибів – продуцентів пероксидаз і прооксидантних сполук .....	227
<b>Висновки до розділу 9</b> .....	232
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	233
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	238
<b>ДОДАТОК А. РИСУНКИ, ЩО ІЛЮСТРУЮТЬ ДАНІ ТАБЛИЦЬ ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ</b> .....	287
<b>ДОДАТОК Б. РОЗРОБКА ЛАБОРАТОРНОЇ ФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ УСТАНОВКИ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ БАЗИДІЄВИХ ГРИБІВ</b> .....	294
<b>ДОДАТОК В. ДОВІДКИ ПРО ДЕПОНУВАННЯ КУЛЬТУР БАЗИДІЄВИХ ГРИБІВ У КОЛЕКЦІЇ КУЛЬТУР ШАПИНКОВИХ ГРИБІВ ІНСТИТУТУ БОТАНІКИ ІМ. М.Г. ХОЛОДНОГО НАН УКРАЇНИ (ІВК)</b> .....	304
<b>ДОДАТОК Г. АКТИ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ У ВИРОБНИЦТВО</b> .....	309
<b>ДОДАТОК Д. ЛИСТ ПРО ПРИСВОЄННЯ ГРИФУ МОН МОНОГРАФІЇ У ВИГЛЯДІ НАВЧАЛЬНОГО ПОСІБНИКА “ЛІКАРСЬКІ РЕЧОВИНИ РОСЛИН І ГРИБІВ”</b> .....	317
<b>ДОДАТОК Е. ВИСНОВКИ АТЕСТОВАНИХ І ЛІЦЕНЗОВАНИХ ЛАБОРАТОРІЙ ЕКСПЕРТИЗИ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ ГРИБНИХ ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ</b> .....	319

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ**

- АО – антиоксидант
- АОА – антиоксидантна активність
- АОЗ – антиоксидантний захист
- АСБ – абсолютно суха біомаса міцелію
- АФК – активні форми кисню
- БАР – біологічно активні речовини
- БМ – біомаса міцелію
- ВРО – вільно-радикальне окислювання
- ГПС – глюкозо-пептонне живильне середовище
- КА – каталазна активність
- КГА – агаризоване живильне середовище картопляно-глюкозний агар
- КР – культуральна рідина
- КФ – культуральний фільтрат
- МГ – міцеліальний гомогенат
- МДА – малоновий діальдегід
- ПА – пероксидазна активність
- ПОЛ – перекисне окислення ліпідів
- ПОА – прооксидантна активність
- СА – агаризоване живильне середовище сусло-агар
- СПАС – стан прооксидантно-антиоксидантної системи
- СФ – спектрофотометр
- ТБК – 2-тіобарбітурова кислота
- ТБК-АП – продукти ПОЛ, активні до тіобарбітурової кислоти
- ФЛ – фосфоліпіди
- ФП – ферментний препарат
- ЧА – синтетичне агаризоване живильне середовище Чапека
- ІВК – Колекція культур шапинкових грибів Інституту ботаніки  
ім. М.Г. Холодного НАН України

## ВСТУП

Царство живої природи – Гриби (*Fungi* або *Mycota*) залишається малодослідженим та останнім часом привертає все більшу увагу багатьох спеціалістів. Цей інтерес пояснюється значними успіхами в області вивчення процесів метаболізму у грибів в цілому, та прогресу в технічному оснащенні процесів культивування, створенням колекцій чистих культур грибів і можливістю їх широкого практичного використання (Ю.Т. Дьяков, 2000; N.A. Bisko et al, 2005; Л.В. Гарибова і ін., 2005; S.P. Wasser, 2010 і ін.).

**Актуальність теми.** Базидієві гриби є джерелом різноманітних природних біологічно активних речовин з широким спектром практичного застосування. Їх використовують в якості дієтичного харчування, харчових добавок, грибних лікарських препаратів, біопрепаратів для захисту рослин і космоцевтиків тощо (В.Г. Бабицкая та ін., 2004-2008; Н.А. Бісько та ін. 2003-2017; W. Chen, 2008; S.P. Wasser et al., 2002-2014). Актуальність вивчення базидієвих грибів обумовлена встановленням їх корисних властивостей, пошуком нових хімічних сполук, вивченням закономірностей і спрямованої регуляції метаболічних шляхів біологічно активних речовин, визначенням біологічної ролі активних метаболітів, зокрема у пристосуванні до різноманітних субстратів та у адаптогенних реакціях і, нарешті, широким застосуванням в біотехнології, екології та господарстві (Л.М. Краснопольская та ін. 2008; W. Chen, 2008; S. Wasser et al., 2002-2014; Н.Л. Поєдинок, 2015). Як наслідок, розробка нових інтенсивних біотехнологій культивування різних видів базидієвих грибів з метою отримання як міцелію, так і біологічно активних сполук з кожним роком стає все більш актуальною.

Створення нових біотехнологій вимагає глибокого вивчення факторів, що регулюють біосинтетичні функції клітин гриба та максимально розкривають їх потенціал. Адаптаційні перебудови полягають у зміні балансу прооксидантно-антиоксидантної системи: активації процесів перекисного

окислення ліпідів і ферментних систем, утворення прооксидантно-антиоксидантних речовин, здатних активно реагувати на дії певних факторів. До функціонально лабільних антиоксидантних речовин, зокрема, відносяться окисно-відновні ферменти каталази (КФ 1.11.1.6), супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1), пероксидази (КФ 1.11.1.7), поліфеноли, пігменти і інші (Т.А. Белозерская та ін. 2007; Н.Н. Гесслер та ін. 2006; A.N. Kapich et al., 2008-2011; M.Y. Lung et al., 2011).

Ксилотрофні базидіомікотові здатні утворювати високоактивні кисневі радикали, які беруть участь у деструкції високомолекулярних речовин, в першу чергу фенольних сполук, лігніну, целюлози тощо. Передбачається, що вивчення механізмів такої деструкції може відкрити шляхи до розробки екологічно чистих енергозберігаючих біотехнологій біодеструкції та біоутилізації хімічно стійких відходів промисловості та переробки лігноцелюлозної сировини. Велике значення в процесі деградації лігніну ксилотрофами відіграють реакції вільно-радикального окислювання, а також синтез цими грибами різних речовин окисно-відновної дії і біоантиоксидантів (A.N. Kapich et al., 2008-2011; M.D. Asatiani et al., 2010). Разом з цим, вивчаються взаємозв'язок між пігментацією і утворенням вторинних метаболітів, антиоксидантна і гензахисна властивості грибних пігментів – каротиноїдів і меланіну (Н.Н. Гесслер та ін. 2006; V.G. Babitskaya et al., 2008-2011).

Детальні дослідження лікарських грибів (*medicinal mushrooms*) показують, що їх фізіологічна дія значною мірою може бути обумовлена наявністю в їх складі антиоксидантних сполук та збалансованістю у системі прооксиданти-антиоксиданти. Проте, дані щодо прооксидантно-антиоксидантної активності базидієвих грибів уривчасті і поодинокі, бракує систематичних досліджень антиоксидантних властивостей біологічно активних сполук цих грибів (С.О. Сирчін, 2015; M.D. Asatiani et al., 2010; V. Elisashvili et al., 2009). Щойно розпочаті дослідження стосовно

використання базидіомікотових у мікотестуванні навколишнього середовища (Г.Л. Антоняк та ін., 2015; І.О. Дудка, 2016).

Таким чином, тема дослідження відповідає актуальним проблемам розвитку біотехнології, мікології та екології і дасть змогу більш повно вивчити прооксидантно-антиоксидантні властивості базидієвих грибів; виявити нові штами – продуценти біоантиоксидантів, пігментів та поліфенолів, антиокисних ензимів; розробити способи регуляції біосинтезу цих біологічно активних речовин, їх виділення та методи оцінки реакції грибних організмів на умови культивування чи довкілля. Отримана під час виконання роботи інформація про фізіологічну активність лікарських грибів, дозволить оцінити біотехнологічний потенціал цих організмів і відкрити перспективи використання їх в промисловості, екології та медицині, послужить основою для одержання препаратів нового покоління, різноманітних харчових добавок та функціональних продуктів грибного походження.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконувалась з 1996 року в наукових лабораторіях кафедри фізіології та біохімії рослин Донецького національного університету імені Василя Стуса МОН України в рамках держбюджетних науково-дослідних проектів, що виконувались за замовленням МОН України та з 2016 року – на кафедрі медичної біології, мікробіології, вірусології та імунології Донецького національного медичного університету МОЗ України: «Вивчення механізмів розвитку і біопродуктивності базидіальних грибів і на їх основі розроблення технології одержання ферментних препаратів, біопрепаратів і харчових продуктів» (1999-2001 рр.), № ДР 0100U001964; «Вивчення біопродуктивності базидіоміцетів і розроблення біотехнології одержання біопрепаратів та харчових продуктів» (2002-2004 рр.), № ДР 0103U003363; «Індукція протеїназ і селекція вищих базидіоміцетів для одержання біопрепаратів та харчових продуктів» (2005-2006 рр.), № ДР 0106U001946; «Розробка засобів біоіндикації екологічного стану Донбасу» (2006-2007 рр.),

№ ДР 0105U002768; «Діагностика екологічного стану середовища індустриального регіону за допомогою розробленої технології комплексної біоіндикації» (2007-2009 рр.), № ДР 0108U001589; «Визначення порогів чутливості біоіндикаторів на дію екологічно несприятливих факторів середовища» (2009-2011 рр.), № ДР 0110U003462; «Одержання ферментних препаратів, підвищення продуктивності базидіоміцетів за культивування на відходах в лабораторних та напівпромислових умовах» (2015-2016 рр.), № ДР 0115U000090. В дослідженнях з названих проектів автор був виконавцем розділів та керівником останньої НДР.

**Мета роботи.** Метою дисертаційної роботи була розробка наукових засад використання прооксидантно-антиоксидантної активності базидієвих грибів для підвищення ефективності процесів їх біотехнологічного культивування.

Для досягнення мети поставлені наступні **завдання**:

- виділити та вивчити ростові характеристики штамів базидієвих грибів;
- встановити рівень та взаємозв'язок показників накопичення біомаси, перекисного окислення ліпідів і прооксидантної, антиоксидантної, оксидоредуктазної активностей в процесі культивування штамів;
- виявити ефективні фактори, що впливають на рівень перекисного окислення ліпідів; прооксидантної, антиоксидантної і оксидоредуктазної активностей в процесі культивування штамів;
- розробити методичні підходи регуляції перекисного окислення ліпідів та прооксидантної, антиоксидантної, оксидоредуктазної активностей в процесі культивування штамів;
- розробити методичні підходи використання показників прооксидантно-антиоксидантної системи для селекції та підвищення ефективності процесів біотехнологічного культивування штамів базидієвих грибів – продуцентів біологічно активних речовин;
- розробити методичні підходи інтенсифікації і оптимізувати схему

біотехнології ферментних препаратів грибних оксидоредуктаз та визначити їх основні фізико-біохімічні характеристики;

- визначити вміст поліфенолів та пігментів – каротиноїдів і меланінів та провести відбір штамів – перспективних продуцентів цих речовин;
- розробити та апробувати способи використання прооксидантно-антиоксидантної активності базидієвих грибів в біотехнології.

**Об’єкти дослідження:** ферментативна і неферментативна складові прооксидантно-антиоксидантної системи 58 штамів 13 видів 9 родин порядків *Polyporales* та *Agaricales* базидієвих грибів в процесі їх біотехнологічного культивування.

**Предмет дослідження:** особливості регуляції прооксидантно-антиоксидантної активності штамів базидієвих грибів з перспективою їх біотехнологічного використання.

**Методи дослідження:** біотехнологічні, мікологічні, мікробіологічні, фізико-біохімічні та статистичні: виділення, культивування та дослідження культурально-морфологічних і біосинтетичних характеристик штамів; спектрофотометричне визначення прооксидантної, антиоксидантної, каталазної і пероксидазної активності, вмісту малонового діальдегіду, поліфенолів і пігментів, водорозчинних білків та їх амінокислотного складу.

**Наукова новизна одержаних результатів досліджень.** Результати проведених експериментальних досліджень розширюють фундаментальні знання про біологічні і прооксидантно-антиоксидантні властивості та біосинтетичну активність ряду видів базидієвих грибів у культурі, створюючи наукові основи їх подальшого практичного використання. Розроблені наукові засади біотехнології отримання і використання прооксидантно-антиоксидантної системи базидієвих грибів.

Вперше комплексно вивчено та кількісно охарактеризовано прооксидантно-антиоксидантну систему 58 штамів 13 видів 9 родин відділу *Basidiomycota*. На основі отриманих даних простежено взаємозв’язок

показників накопичення біомаси, перекисного окислення ліпідів та прооксидантної, антиоксидантної, оксидоредуктазної активностей в процесі культивування штамів базидієвих грибів в умовах періодичної поверхневої культури.

Вперше виявлено чинники культивування, які відкривають можливість регуляції синтезу прооксидантно-антиоксидантних речовин, активності ферментів і інтенсивності процесів перекисного окислення ліпідів. Розроблено науково обґрунтовані методичні підходи інтенсифікації біотехнології культивування біосинтетично активних штамів, що мають переваги перед відомими.

Шляхом модифікації схеми біотехнологічного процесу, удосконалення складу живильного середовища і методів виділення, експериментально одержано нові екстра- і інтрацелюлярні грибні ферментні препарати каталаз і пероксидаз. Вперше досліджено їх основні фізико-біохімічні характеристики, визначено вміст білку і кількісний амінокислотний склад.

Встановлено вміст поліфенолів та пігментів – каротиноїдів і меланінів в культурах штамів базидієвих грибів. На основі отриманих даних виявлені штами – перспективні продуценти поліфенолів, каротиноїдів та меланінів.

Розроблені та перевірені в напівпромислових умовах науково обґрунтовані способи регулювання прооксидантно-антиоксидантної активності базидієвих грибів при культивуванні штамів-продуцентів біологічно активних речовин та біодеструкції полютантів.

**Практичне значення отриманих результатів.** Практичне значення роботи полягає у вирішенні актуальної проблеми суспільства – залученні нових об'єктів біотехнології до процесів отримання затребуваних біологічно активних речовин та способів біоконверсії і біоутилізації відходів. Одержано такі практичні результати.

Створено наукові засади біотехнологічного використання прооксидантно-антиоксидантних властивостей базидієвих грибів. Інтродуковано в культуру 58 штамів, що належать до 13 видів 9 родин



порядків *Polyporales* та *Agaricales* базидієвих грибів (відділ *Basidiomycota*). Штами депоновано у Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК), що має статус Національного надбання України. Розроблені нові живильні середовища для культивування штамів базидієвих грибів, що забезпечують підвищення біосинтетичних можливостей штамів. Запропоновані модифіковані технології, що дозволили виділити нові грибні ферментні препарати каталаз і пероксидаз. Отримані нові дані з кількісного амінокислотного складу ферментних препаратів та їх біохімічних характеристик; вмісту поліфенолів і пігментів та динаміки синтезу каротиноїдів.

Нові технологічні рішення культивування штамів базидієвих грибів з підвищеним вмістом прооксидантно-антиоксидантних речовин по відношенню до традиційних джерел цих речовин та використання грибних ферментних препаратів апробовано та впроваджено на Донецькому міському молочному заводі № 2, ТОВ «УкрМіцелій», ТОВ «Біотехнологія», Інституті хімічних технологій СХУ ім. В. Даля (м. Рубіжне).

Наукові і науково-практичні результати дисертаційної роботи використано в навчальному процесі на біологічному факультеті Донецького національного університету.

**Особистий внесок здобувача.** Робота є самостійним дослідженням здобувача. Автором особисто обрано напрям досліджень, розроблено концепцію роботи, здійснено пошук та аналіз літературних даних, розроблено робочі гіпотези та обґрунтована методологія постановки експериментів. Здійснено експедиційні виїзди з метою збору мікологічного матеріалу, аналіз видового складу та виділення чистих культур базидіомікотових, проведені дослідження та статистична обробка результатів. Окремі розділи експериментальної роботи виконувались за участю співробітників, аспірантів і студентів біологічного факультету ДонНУ під керівництвом автора, що знайшло відображення у співавторстві в публікаціях і патентах. Здобувачем проаналізовано і узагальнено результати досліджень, сформульовано

висновки, оформлено їх в вигляді публікацій. Обговорення результатів та висновків проведено здобувачем у творчому співробітництві з науковим консультантом д.б.н. Н.А. Бісько і д.б.н. Е.Ф. Соломко, яким здобувач висловлює особливу вдячність за підтримку та поради під час аналізу й обговорення результатів роботи.

**Апробація результатів дисертації.** Результати наукових досліджень за темою дисертації були представлені та доповідалися на всеукраїнських і міжнародних наукових конференціях та з'їздах, включаючи зокрема:

X з'їзд Українського ботанічного товариства (Полтава, 1997); International conference «Molecular genetics and biotechnology» (Minsk, 1998); International conference «Modern problems of mycology, algology and phytopathology» (Moscow, 1998); International conference «Problems of microbiology and biotechnology» (Minsk, 1998); XI з'їзд Українського ботанічного товариства (Харків, 2001); International conference «On molecular biology and genetics» (Kyiv, 2001); International conference «Successes of medical mycology» (Moscow, 2003); International conference «Mycology and Algology» (Moscow, 2004); International conference «Plant and Microbial Enzymes: isolation, characterization and biotechnology applications» (Tbilisi, 2007); Міжнародна конференція «Актуальні проблеми ботаніки та екології» (Київ, 2007); Міжнародна конференція «Харчові добавки. Харчування здорової людини» (Донецьк, 2009); Міжнародна конференція «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів» (Київ, 2010); China International Patent Fair (CIPF, Dalian, 2010), Всеукраїнська конференція «Ботаніка та мікологія: проблеми і перспективи на 2011-2020 роки» (Київ, 2011), Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання розвитку біології та екології» (Вінниця, 2016) тощо.

**Перелік публікацій за темою дисертації.** Основні положення та результати дисертаційної роботи опубліковано у 60 працях, серед яких: 36 наукових фахових статей (у т.ч. 2 статті у виданнях іноземних країн, 15 статей у вітчизняних журналах, які представлено у міжнародних

наукометричних базах даних), 7 статей у інших наукових виданнях України, 9 тез доповідей, 7 патентів України на корисні моделі і 1 деклараційний патент України.

**Структура та обсяг дисертації.** Загальний обсяг дисертації становить 325 сторінок, зокрема основний зміст роботи викладено на 288 сторінках комп'ютерного тексту. Дисертація містить розширену анотацію (українською і англійською мовами), зміст, вступ, огляд літератури, розділ 2 «Матеріали і методи досліджень», експериментальні дослідження, викладені в розділах 3, 4, 5, 6, 7, 8 і 9, висновки, список використаних джерел, додатки до дисертації. Робота включає 23 таблиці і 38 рисунків. Список використаних джерел містить 425 найменувань, з-поміж яких 245 – латиницею.

## РОЗДІЛ 1.

### НАУКОВО-ПРАКТИЧНІ АСПЕКТИ РЕГУЛЮВАННЯ І ВИКОРИСТАННЯ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ БАЗИДІЄВИХ ГРИБІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

#### 1.1. Сучасний стан та перспективи використання культур базидієвих грибів у біотехнології

##### 1.1.1. Основні напрямки практичного використання базидієвих грибів у біотехнології

До основних складових біотехнологічного процесу відноситься, в першу чергу, біологічний агент. Номенклатура біологічних об'єктів, що використовуються в біотехнології постійно розширюється, це [71, 121, 272]:

- клітини мікроорганізмів, грибів, рослин, тварин і людини, у тому числі одержані методами генної та клітинної інженерії;
- віруси, у тому числі бактеріофаги;
- компоненти клітин: органоїди, внутрішньоклітинні ферменти, протеїни та інші складові;
- позаклітинні продукти: ферменти, вітаміни, поверхнево активні речовини та інші метаболіти;
- іммобілізовані клітини, їх компоненти та позаклітинні продукти.

Найважливіше місце серед біологічних агентів займають традиційні з них – клітини мікроорганізмів, у тому числі і міксоміцетів. Все більша увага приділяється до вивчення перспектив практичного використання у біотехнології культур базидієвих грибів.

Гриби – це численна, дуже поширена своєрідна група гетеротрофних організмів, позбавлених хлорофілу. Нині описано понад 100 тис. різних видів грибів. Згідно з концепцією про існування п'яти царств живих організмів, що запропонована у 1969 р. Р. Уїттейкером, гриби мають статус окремого царства (*Fungi* або *Mycota*, *Mycetalia*) органічного світу [56, 75].

Молекулярно-біологічні і генетичні дослідження грибів, проведені упродовж останніх років, підтвердили одержані раніше дані про гетерогенність царства *Fungi*. Відповідно до результатів цих філогенетичних досліджень, класифікація грибів уточнюється [76]. Сучасний період розвитку мікології, який розпочався з 40-х рр. XX ст., корегується відповідно новітніх наукових даних та характеризується фізіолого-біохімічним вивченням грибів на різних рівнях їх дослідження – молекулярному, клітинному і субклітинному, організменному, асоціативному та біоценологічному [56, 75, 76, 398]. Основний напрям цього періоду – використання результатів таких досліджень у біотехнології та екології.

Вдалу схему, яка відображає позитивне і негативне значення грибів та грибоподібних організмів приводять автори відомого підручника з мікології *Alexopoulos et al.*, 1996 [56]. На рис. 1.1. надається доповнена і модифікована нами схема різнобічного значення грибів для людини.

Базидіомікотові відіграють величезну роль в природі та житті людини.

В природних біогеоценозах вони є найважливішими редуцентами – їх головна функція полягає в трансформації органічних речовин [4, 9, 18, 89].

Через те, практичне використання грибів базується, перш за все, на їх еколого-трофічних особливостях [55, 79, 249]. Різноманіття умов існування і трофічних зв'язків грибів в різних біогеоценозах зумовлює утворення екологічних груп, під якими розуміють сукупності популяцій різних видів, що об'єднуються за ознаками трофічних і екологічних зв'язків.

Екологічні групи грибів не пов'язані з систематичним положенням видів, що входять до них. У результаті подібності місцеперебувань грибів у ході розвитку можуть з'явитися подібні фізіологічні та біохімічні функції (наприклад, у копротрофних, лігнотрофних і представників інших екологічних груп грибів). Виникнення екологічних груп грибів – складний і тривалий процес. Він є наслідком всього еволюційного розвитку грибів, результатом їх численних адаптацій до умов існування.

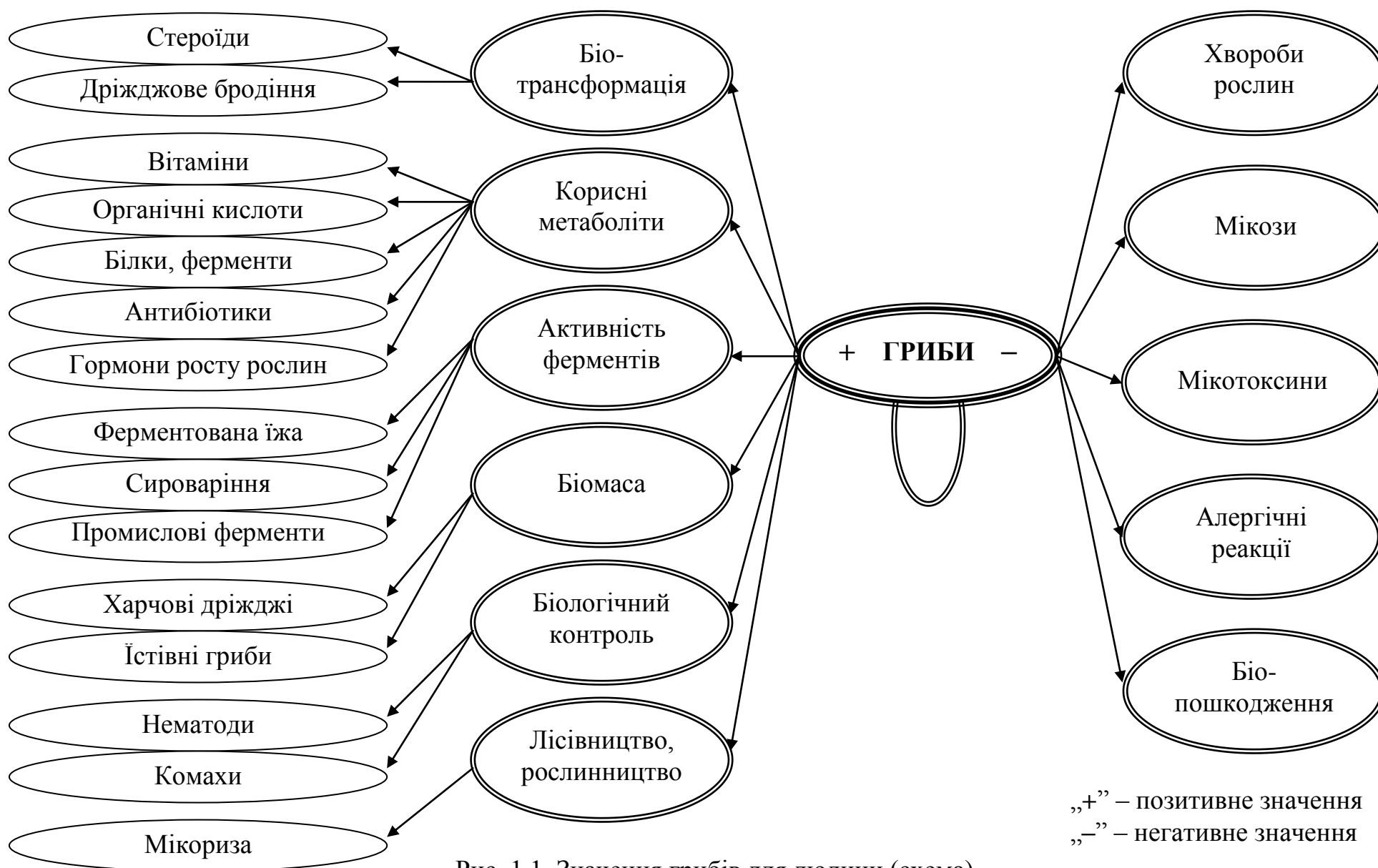


Рис. 1.1. Значення грибів для людини (схема).

У процесі еволюції у грибів з'являється цілий ряд нових морфолого-функціональних ознак, що значно збільшують їх конкурентну спроможність. Це перш за все хемо-, гідро-, фото-, гео- та інші таксиси, що дозволяють грибам повніше використати живильний субстрат і обумовлюють їх головну функцію редуцентів в кожному біогеоценозі [4, 89, 179].

Величезну роль у формуванні екологічних груп грибів відіграють біохімічні адаптації, що дозволяють їм пристосовуватися до нових субстратів і абіогенних факторів. Багато видів грибів здатні утворювати біологічно активні сполуки (антибіотики, терпени, стерини, токсини тощо), що виконують регуляторні функції (з цим, наприклад, пов'язані частково такі явища, як токсикози ґрунтів і “ґрунтовий фунгістазис”). Гриби-паразити виробляють біологічно активні речовини, що регулюють процеси метаболізму і проникність клітинних мембран в їх специфічному середовищі – хазяїні. Всі ці приклади свідчать про те, що механізми і шляхи формування екологічних груп грибів різноманітні і відбуваються як наслідок пристосування до умов існування.

Субстрат є важливим фактором у житті грибів, оскільки як гетеротрофні організми вони отримують з нього всі необхідні живильні речовини. За типом трофічних і екологічних зв'язків виділяють такі екологічні групи грибів: сапротрофи (гумусові й підстилкові), ксилотрофи, копротрофи, мікотрофи, бріотрофи, сфагнотрофи, герботрофи, карботрофи, гриби філосфери рослин та інші [56, 74, 249].

Існування різних екологічних груп грибів, що мають різноманітні морфолого-функціональні ознаки та сформовані біохімічні адаптації, відкриває шляхи практичного використання їх культур.

І тут, в першу чергу треба сказати про дереворуйнівні гриби (ксилотрофи, ксилофіли, лігнотрофи). Розкладання деревини – одне з основних ланок біологічного кругообігу речовин у природі. Деструкція деревини здійснюється комплексом організмів, які послідовно змінюють один одного. Провідна роль у руйнуванні деревини належить

дереворуйнівним грибам з різних систематичних груп: базидіомікотів, аскоміцетів, дейтероміцетів. Групу ксилотрофів ділять на дві підгрупи: гриби-паразити і гриби-сапротрофи. Процес руйнування деревини починають паразити, що вражають живі дерева. Деякі з них продовжують свій розвиток і на відмерлій деревині, переходячи до сапротрофізму. Основну роль у деструкції деревини на перших стадіях її розкладання відіграють облігатні сапротрофи з сумчастих і недосконалих грибів. Надалі вони змінюються спеціалізованими базидієвими ксилотрофами.

Ксилотрофи – типові мешканці лісів, чітко окреслена екологічна група грибів, що мешкають на рослинних рештках. Вони ростуть на стовбурах та коренях живих дерев, сухостої, трісках, стовбурах і гілках, на пнях і шматочках деревини у ґрунті чи на поверхні. Для їх розвитку необхідна більш-менш постійна кількість вологи.

За трофічною ознакою – типом гнилизни деревини, що викликають ксилотрофи, їх поділяють на дві групи: лігнотрофи, що розкладають головним чином лігнін і провокують білу гнилизну та гриби, що живляться переважно целюлозою і викликають буру гнилизну деревини [4, 75].

До ксилотрофів-паразитів відносяться багато видів афілофоральних грибів, наприклад, *Phellinus igniarius* (L.: Fr.) Quél., *Heterobasidion annosus* (Fr.) Bref., *Phaeolus schweinitzi* (Fr.) Pat., *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat., *Oxyporus populinus* (Schw.: Fr.) Donk і багато інших. Значно менше їх серед агарикальних грибів. У першу чергу це опеньок осінній справжній *Armillariella mellea* (Vahl.: Fr.) Karst., що паразитує на 200 видах деревних і чагарникових рослин.

До ксилотрофів-сапротрофів відносяться, наприклад, більшість видів поліпорових грибів, що мають в основному багаторічні копитоподібні плодові тіла. Найбільш відомими представниками поліпорових є *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) Gill., *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) Karst., *Daedalea quercina* L.: Fr. Останній вид – дуже широко поширений гриб, що росте на пнях і мертвих стовбурах багатьох широколистяних дерев (дуба, бука,



каштана), а також на обробленій деревині і викликає буру гнилизну. З інших афілофоральних сюди відносяться значна частина стереумових, рогатикових та інших [4, 74]. Агарикальні гриби серед ксилотрофів-сапротрофів представлені багатьма видами строфарієвих (роди *Pholiota*, *Hypholoma*), рядовкових (рід *Pleurotus*) та інші [74, 89].

Ксилотрофи здатні рости на відносно дешевих живильних середовищах в умовах рідкофазового (поверхневого або глибинного) чи твердофазового культивування, не дають спороношення на стадії вегетативного росту, що нівелює небезпеку професійних захворювань людей, зайнятих у біотехнологічному виробництві. Одержання їх екзометаболітів не потребує великих затрат. Завдяки цим властивостям, ксилотрофи мають добрі перспективи застосування у сучасній біотехнології деструкції складних хімічно стійких субстратів, отримання їстівних плодових тіл та різноманітних біологічно активних речовин.

Скринінг штамів базидієвих грибів зазвичай здійснюють з метою отримання культур, що характеризуються:

- швидким та рясним ростом міцелію з високим вмістом білку або
- активним синтезом біологічно активних речовин незалежно від якості плодоношення.

Визначальний вплив на характер росту і спрямованість метаболізму продуценту мають способи культивування, певні температурні і рН параметри, постачання культури киснем, швидкість дифузії живильного середовища, відтік продуктів-інгібіторів метаболізму тощо [20, 121].

Встановлено, що спостерігається взаємозв'язок між біосинтетичною активністю і еколого-трофічним типом грибів. Показано, що переважна більшість біосинтетично активних штамів відноситься до грибів, що провокують білу гнилизну деревини, лігнотрофів. Еволюція цих грибів йшла шляхом пристосування до нових умов існування: освоєння нових лігноцелюлозних субстратів листяних порід дерев, порівняно широкого розповсюдження. Розклад лігніну відбувається за участю комплексу

ферментів (переважно – оксидоредуктаз) [15, 124, 126]. Також встановлено, що велике значення в процесі деградації лігніну ксилотрофами мають реакції вільно-радикального окислення [82-84, 189-192, 283-285]. Проводяться масштабні дослідження, спрямовані на вивчення механізмів розщеплення лігніну ксилотрофними базидієвими грибами, оскільки передбачається, що пізнання цих механізмів може відкрити шляхи для розробки екологічно чистих, енергозощадних біотехнологій переробки хімічно-стійкої сировини [8, 15, 79, 190].

Особливе місце посідає надзвичайно своєрідна за своєю біологією екологічна група видів грибів, що знаходяться в симбіозі з коренями вищих, або судинних, рослин, – мікоризні. Важко переоцінити роль та біотехнологічні перспективи мікоризних грибів, що знаходяться в симбіозі з вищими деревинними і трав'янистими рослинами [56, 107].

Корисні властивості грибів відомі людині з найдавніших часів, яка використовувала мікроорганізми і гриби у процесах при хлібопеченні, готуванні кисломолочних продуктів, у виноробстві тощо. Але лише завдяки роботам Луї Пастера в середині XIX ст., що доказали зв'язок процесів шумування з діяльністю цих організмів, традиційна біотехнологія одержала наукову основу.

Чимале значення і великі перспективи грибів у біотехнології отримання лікарських препаратів. Наприклад, антибіотиків і інших біологічно активних речовин: вітамінів, гормонів, ферментів, органічних кислот, токсинів тощо [64, 108, 396-400].

У середині XX ст., коли був здійснений біосинтез пеніцилінів методами ферментації, почалася ера антибіотиків, що дала поштовх розвитку мікробіологічного синтезу і створенню мікробіологічної промисловості. На цей же час припадає остаточне утвердження грибів, як об'єктів біотехнології [14, 20].

При культивуванні селективно відібраних штамів грибів в умовах виробництва отримують цілу низку препаратів, які широко використовують у

різних галузях. Приміром, у фармації це антибіотики широкого спектра дії, вітаміни; у харчовій промисловості – пектинази, протеази, амілази, каротиноїди (наприклад, астаксантин, що надає м'якоті лососевих риб червоно-жовтогарячий відтінок), білок, визрівання сирів типу рокфор і камамбер, отримання соєвого соусу; для виробництва кормів – целюлази; для підвищення продуктивності рослин – гібереліни і цитокініни, а для їх захисту від ґрунтових патогенів – триходермін [12, 36, 179, 375].

У 60-70-ті роки ХХ ст. почала бурхливо розвиватися клітинна інженерія. Зі створенням у 1972 році групою П. Берга в США першої гібридної молекули ДНК *in vitro* формально пов'язане народження генетичної інженерії, що відкрила шлях до свідомої зміни генетичної структури організмів таким чином, щоб ці організми могли виробляти необхідні людині продукти і здійснювати необхідні процеси. Ці два напрямки визначили образ нової біотехнології, що має мало спільного з тією простою біотехнологією, яку людина використовувала протягом тисячоріч. Показово, що в ці роки набув поширення і самий термін „біотехнологія” [20, 121].

Отже, біотехнологія за сучасними уявленнями – це використання хіміко-біологічних процесів і біологічних об'єктів (мікроорганізмів, культур клітин і тканин рослинного, грибного і тваринного походження, ферментних препаратів та інших біологічно активних речовин) у промисловому виробництві.

Відповідно до визначення Європейської федерації біотехнологів, біотехнологія базується на інтегральному використанні біохімії, мікробіології, молекулярної біології, клітинної та генетичної інженерії з метою промислової реалізації властивостей мікроорганізмів, культур клітин і тканин. Уже в самому визначенні біотехнології відображено її місцезорешування як прикордонного, завдяки чому результати фундаментальних досліджень у сфері біологічних, хімічних і технічних дисциплін набувають прикладного значення.

З подальшим розвитком біотехнології пов'язують вирішення глобальних проблем людства – ліквідацію нестачі продовольства, енергії, мінеральних ресурсів, поліпшення стану охорони здоров'я і якості навколишнього середовища.

Внесок біотехнології в сільськогосподарське виробництво полягає в полегшенні традиційних методів селекції корисних організмів та розробці нових технологій, що дозволяють підвищити ефективність сільського господарства [20].

Культури мікроорганізмів та ґрунтових мікроміцетів, виведені методами біоінженерії, також можуть спонукати до ширшого застосування безвідвальної обробки ґрунту, що в кінцевому рахунку призведе до зменшення витрат і підвищення родючості ґрунту. Ще одним напрямком біотехнологічного використання грибів є штучне використання мікоризи для оптимізації умов вирощування рослин у рослинництві і лісівництві.

Перспективним напрямком розвитку біотехнології у сільському господарстві є пошук нових та створення методами генетичної і клітинної інженерії високопродуктивних і стійких до хвороб та шкідників штамів їстівних грибів. Розробка технології оздоровлення міцеліальних культур від накопичених інфекцій особливо важлива для культур, які розмножуються (підтримуються) вегетативно.

Біотехнологія надає можливість отримувати штами грибів, захищені від певних різновидів вірусів. Шляхом перенесення маленької частки ДНК (РНК) від вірусу до генетичної структури гриба, дослідники мають отримати штами, у яких є імунітет до певних хвороб [122].

Люди вживають гриби в їжу із глибокої стародавності. Штучне вирощування грибів здатне внести й інший, не менш важливий внесок у справу забезпечення продовольством, особливо харчового білка, зростаючого населення земної кулі. Тому зробити гриби такою ж керованою сільськогосподарською культурою, як зернові злаки, овочі, фрукти, давно вже стало актуальним завданням. В цьому аспекті дуже перспективним є

штучне вирощування їстівних грибів за допомогою різноманітних біотехнологічних процесів, причому не тільки їх плодових тіл, а й біомаси міцелію, який за своїми якостями не поступається плодовим тілам [18, 22, 211, 212, 363]. Найбільше легко піддаються штучному вирощуванню дереворуйнівні гриби. Це пов'язане з особливостями їхньої біології, зокрема здатністю добре рости й плодоносити на доступних субстратах [22, 90, 258].

Штучне розведення дереворуйнівних грибів отримало досить широке поширення. Міцелій їстівних грибів можна вирощувати на рідких середовищах, наприклад на молочній сироватці, пивному суслі та інших, у спеціальних ферментерах (біореакторах), у глибинній культурі. Це повністю механізований і автоматизований процес [36, 121]. Так, на кафедрі фізіології та біохімії рослин ДонНУ розроблені й апробовані в експериментальному виробництві способи вирощування штамів базидієвих грибів та одержання грибних ферментних препаратів з високою ферментативною і антиоксидантною активністю [161, 174, 255]. Дослідження в цьому напрямку тривають.

Опрацьовані можливості керування процесами росту і біосинтезу культур грибів з використанням регуляторів росту та синтезу певних метаболітів. Цікавими можуть бути дослідження з поліпшення амінокислотного складу грибних білків шляхом створення геномодифікованих організмів.

Біотехнологічні процеси з використанням ферментів мікроорганізмів і грибів уже на сучасному технічному рівні широко застосовують у харчовій промисловості [36, 92, 122]. Промислове вирощування культур клітин, в тому числі і трансгенних організмів, використовують для одержання багатьох цінних сполук – ферментів, гормонів, амінокислот, вітамінів, антибіотиків, метанолу, ізобутанолу, органічних кислот (глутамінової, оцтової, лимонної, молочної) тощо. За допомогою мікроорганізмів і грибів проводять біотрансформацію одних органічних сполук в інші (наприклад, розклад лігноцелюлози, сорбіту у фруктозу тощо) [121, 130]. Перспективні розробки

у біотехнології отримання каротиноїдів і жирів з дріжджів родів *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula* та *Cryptococcus* [81].

Широке застосування в різноманітних виробництвах одержали іммобілізовані ферменти мікроорганізмів і грибів [20, 36]. Для виділення біологічно активних речовин зі складних сумішей (культуральної рідини чи гомогенату міцелію) перспективне використання моноклональних антитіл. Роботи, розпочаті у другій половині ХХ ст. з розробки технологій, живильних середовищ та біореакторів для культивування штамів – активних продуцентів певних речовин, продовжуються на основі використання останніх даних з біології штамів-продуцентів та залученням новітніх розробок у галузях біологічних, екологічних, хімічних і технічних наук.

Зокрема, такі біотехнології використовують для охорони навколишнього середовища. Це біотехнологічні методи переробки сільськогосподарських, промислових і побутових відходів, очищення стічних вод. Деякі дріжджі та інші гриби знаходять застосування у сфері біоремедіації (біологічного очищення території). Одним з прикладів є гриби *Yarrowia lipolytica*, які переробляють пальмову олію у стічних водах млинів, ТНТ (вибуховий матеріал) та багато інших вуглеводнів, зокрема нафтових забруднень – у алкани, жирні кислоти, жири й олії. Дейтероміцет *Candida utilis* росте в сульфідних стічних водах та очищує ці відходи паперової промисловості. *Trichosporon cutaneum*, що окисляє численні органічні сполуки, включаючи деякі токсичні (наприклад, фенол), відіграє важливу роль у системах аеробної переробки стоків [113, 172]. Вивчаються шляхи розкладу природних ароматичних структур і ксенобіотиків грибами різних систематичних груп [113, 124]. Проводяться широкомасштабні дослідження з біоконверсії рослинної сировини базидієвими грибами [15, 130, 190, 249].

Біотехнологія може надати споживачам можливість вибору з якомога ширшого переліку безпечних продуктів – не лише в сільському господарстві та переробній промисловості, але й і в інших галузях, зокрема і в медицині.

У медицині біотехнологічні і нанобіотехнологічні прийоми і методи

відіграють головну роль при пошуку та створенні нових біологічно активних речовин і лікарських препаратів, призначених для ранньої діагностики і лікування різноманітних захворювань. Стрімко розвивається нанобіотехнологія [71]: розробляються абсолютно оригінальні методи, які використовують для отримання високотехнологічних матеріалів різноманітні біоб'єкти – гриби, дріжджі та бактерії. Вони дозволяють домогтися позитивних результатів, уникаючи важких хімічних впливів. Антибіотики – найбільший клас фармацевтичних сполук, одержання яких здійснюється за допомогою мікробіологічного синтезу із застосуванням штамів грибів [121, 188, 396]. Змінюючи нуклеотидну послідовність у генах, що кодують відповідні білки, оптимізують структуру ферментів, гормонів і антигенів (так звана білкова інженерія).

В останні роки спостерігається помітне підвищення уваги до створення біотехнологій одержання харчових додатків, лікувально-профілактичних засобів та лікарських препаратів з вищих базидієвих грибів, в першу чергу тих видів, що вже добре відомі у світі як їстівні та лікарські [9, 12, 21-26, 90, 196-204, 211-213, 270, 271, 396-401].

Ще на початку 90-х років XX ст. в Інституті ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України була розроблена оригінальна технологія глибинного культивування *Pleurotus ostreatus* для одержання біомаси харчового призначення, яка планувалася для впровадження на підприємствах мікробіологічної промисловості. Автори технології показали, що глибинний міцелій є цінним харчовим додатком з лікувально-профілактичними властивостями, зокрема антисклеротичними, антиоксидантними, інтерфероногенними, протипроменевими та радіопротекторними активностями, доведеними у дослідях на тваринах [26, 33, 64, 72, 132, 361-363]. Розвиток цього напрямку досліджень з розширенням мікологічних об'єктів дозволив відкрити нові напрями використання базидієвих грибів у харчовій та медичній галузях [211-213, 242, 361-363].

Дані про численні лікувально-профілактичні (превентивні) харчові

добавки, що випускаються у різних країнах світу у вигляді сухих порошків у капсулах або таблетках, у вигляді водних або спиртових екстрактів і різноманітних оздоровчих напоїв із базидієвих грибів, наводяться також у ряді оглядових публікацій [220, 265, 270, 271, 375, 413, 417].

Передові позиції у розробці біотехнологій виробництва чистих медичних препаратів фармакологічно активних речовин, ізольованих із вищих базидієвих грибів, займають Японія та Китай [413]. Полісахарид-пептид крестин (комерційна назва препарату PSK), який отримують шляхом екстракції міцелію *Trametes versicolor*, випускають у вигляді капсул для перорального застосування і використовують у лікувальній практиці як імуномодулятор та протипухлинний засіб в поєднанні з хіміо- та радіотерапією. Знайшли широке застосування препарати з глибинно вирощеного міцелію: *Lentinula edodes* – протираковий полісахарид-пептид лентинан в капсулах; *Armillariella tabescens* – таблетки, які знижують тиск і посилюють секреторні функції; *Hericium erinaceus* – таблетки, які стимулюють імунну систему, *Marasmius androsaceus* – таблетки, які застосовують при різноманітних видах невралгій та ревматоїдних артритих; *Armillariella mellea* – таблетки для лікування нервових захворювань, зокрема епілепсії. Таблетки з міцелієм *Ganoderma lucidum*, що містять полісахариди, ергостерол, манніт та компоненти терпеноїдної природи, рекомендують при хронічних бронхітах та для підвищенні коронарного тиску. Препарат тремеластін в капсулах із *Tremella fuciformis* з протипроменевими та імуностимулюючими властивостями застосовують при хіміо- та радіотерапії хворих на рак. Він показав також антиалергенну та протидіабетичну активність [594, 596, 665]. Із видів роду *Tremella* поряд з найбільш відомим видом *T. fuciformis*, ще два види, а саме *T. cinnabarina* і *T. mesenterica*, мають тонізуючі і лікувальні властивості, а вид *T. foliacea* застосовується при гінекологічних хворобах [220, 418]. Внаслідок вивчення фармакологічної дії екстрактів плодових тіл та глибинного міцелію *T. fuciformis* та *T. mesenterica* показано, що біологічно активним компонентом є полісахарид



глюкуронооксиломаннан, який виділяється послідовно шляхом екстракції гарячою водою та етанолом. Виявлено, що ця речовина впливає на гуморальні та клітинні фактори імунітету, відновлює функції імунної системи при дії імуносупресантів, хіміотерапії, стресах та процесах старіння [413].

На тепер встановлено, що деякі грибні біологічно активні метаболіти різноманітної хімічної будови мають також комбіновану терапевтичну дію – антибактеріальну, антифунгальну, протипухлинну і антивірусну. Грибні біологічно активні речовини, переважно, є продуктами вторинного метаболізму. Встановлено, також, що вони містяться не тільки в плодовому тілі, але й у міцелії як їстівних, так і отруйних видів. Однак варто зауважити, що високий ступінь токсичності деяких грибних метаболітів, відповідно, може обмежувати їхнє застосування в медичній практиці [400, 413].

За результатами роботи *China International Patent Fair* (CIPF), спостерігається помітне збільшення кількості біотехнологічних розробок, що стосуються одержання лікувально-профілактичних засобів, лікарських препаратів та харчових додатків, шляхом культивування вищих базидіальних грибів, в першу чергу тих видів, що визнані як їстівні та лікарські.

Грибні культури широко використовуються у науці і як модельні організми для досліджень у генетиці, молекулярній і клітинній біології. Як приклад, можемо навести пекарські дріжджі – *Saccharomyces cerevisiae*, які були першими з еукаріотів, для яких була повністю визначена послідовність геному ДНК. Подальше дослідження генетичних особливостей широкого переліку грибних організмів дозволили встановити, що у них є два основних типи онтогенезу: цикли агамних грибів, які представлені цикломорфозом, та цикли еугамних грибів, які мають статевий процес; внести корективи у їх систематику [89, 136].

Вивчення двофакторної (тетраполярної) системи сумісності у вищих базидіомікотів, зокрема у *Agaricus bisporus*, *Flammulina velutipes*, *Lentinus edodes*, *Laetiporus sulphureus*, *Pleurotus ostreatus*, *Schizophyllum commune* і ін.,

дозволило розширити біотехнологічні можливості цих організмів. Оскільки встановлено, що фактори сумісності є регуляторними генами і контролюють діяльність багатьох інших генів, що відповідають за морфогенетичну послідовність процесів при схрещуванні та подальшому розвитку базидієвих грибів [76, 136].

Серед грибів багато найнебезпечніших паразитів рослин, в тому числі сільськогосподарських, яким вони наносять значний збиток врожаю, особливо при масовому розвитку фітопатогенів, коли виникають так звані епіфітотії (аналогічні епідеміям серед людей та епізоотіям серед тварин). Є серед грибів збудники хвороб людини і тварин [4, 56, 375].

Велика роль грибів як біодеструкторів різноманітних матеріалів і виробів. Вони здатні наносити велику шкоду, псуючи не тільки вироби із деревини, тканини, шкіри, паперу, але навіть зі скла, пластику й металу. Але, і ці, на перший погляд, негативні властивості грибів можна використовувати в боротьбі зі шкідниками чи переробці промислових і побутових відходів [56, 400].

Отже, з'ясування значення грибів в природі і житті людини обґрунтувало наукові основи і напрямки використання їх у сучасній біотехнології. Це сприяло:

- вдосконаленню методів та подальшому вивченню корисних властивостей і метаболітів грибних організмів;
- дослідженню історії використання грибів у фунготерапії;
- формуванню колекцій чистих міцеліальних культур;
- вивченню онтогенезу та генетичних характеристик грибів;
- розробці апаратури для реалізації біотехнологічних процесів та технологій ферментації і отримання кінцевих продуктів – антибіотиків, ферментів, полісахаридів, амінокислот, органічних кислот тощо;
- вдосконаленню методів контролю і керування біотехнологічними процесами (моделювання та оптимізації процесів отримання

цільових продуктів);

- впровадженню критеріїв оцінки ефективності біотехнологічних процесів (швидкості росту продуцента, виходу продукту, економічного коефіцієнту і непродуктивних витрат енергії, витрат на знешкодження відходів);
- вивченню фізико-хімічних факторів, які впливають на продуктивність і економіку біотехнологічних процесів;
- розвитку біотехнологій, які вирішують екологічні і енергетичні проблеми: отримання білкововмісних продуктів з відходів сільськогосподарського та харчового виробництва, біодеградації лігноцелюлозних субстратів тощо.

Зазначимо, що інтерес дослідників до природних сполук будь якого походження пов'язаний з пошуком нових хімічних структур. Втім в останній час значно актуальніші і затребувані є властивості природних сполук і перш за все рівень і характер їх біологічної активності. Високоефективний скринінг (*high-throughput screening* – HTS), який використовують провідні фармацевтичні фірми, практично вичерпав наявні в різних наукових закладах запаси природних сполук і синтетичних продуктів, біологічна активність яких раніше не зацікавлювала дослідників. Потреби фармацевтичної індустрії стимулювали розвиток комбінаторної хімії (*combinatorial chemistry*), яка дозволяє проводити одночасний синтез великої кількості хімічних речовин. Однак комбінаторна хімія не скорочує строки розробки лікарських препаратів, хоч значно розширює можливості їх пошуку. Цікаво відмітити, що теперішня фармакологія оперує з більше як 2000 видами біологічної активності [162].

В останні десятиріччя активність по створенню ліків на основі природних продуктів (*natural product-based drug discovery* – NPDD) в різних країнах світу сильно конкурувала з високоефективним скринінгом, комбінаторною хімією і генетичними дослідженнями. Аналіз активності NPDD в Японії показав, що серед досліджених мікроорганізмів найбільш

широко були представлені грибні організми із таких таксонів і екологічних груп, як аскоміцети, мітоспорові, ґрунтові і гриби, що мешкають на лісовій підстилці. При цьому компанії стикнулися з труднощами отримання біологічного матеріалу із інших країн світу в силу дії Конвенції по біологічному розмаїттю. Можливості для пошуку перспективних штамів розширюються разом з вивченням біорізноманітності. Залучення в орбіту досліджень грибних організмів з складною трофікою і екологією, які рідко зустрічаються, не тільки дозволить розширити пошук, але і буде сприяти отриманню нової інформації з їх біології і фізіології, біохімії і генетики [4, 179, 295].

І.О. Дудка та Г.Л. Антоняк і співавтори відмічають, що важливим і найбільш гарантованим засобом збереження біорізноманіття є система природно-заповідного фонду (ПЗФ), фундаментом якої є заповідники та національні природні парки. На території об'єктів ПЗФ зберігається близько 75% усього біорізноманіття України [4, 74, 242].

На жаль, заповідники і національні природні парки створені не в усіх біогеографічних областях, до того ж вони розміщені на території України нерівномірно. Найбільші площі охоронюваних територій в Україні (5-14%) приурочені в основному до Правобережжя, його західних і північно-західних областей, де природна рослинність зазнала меншого антропогенного впливу, де менший відсоток розораних земель, збереглися великі лісові масиви. Інша ситуація спостерігається на Лівобережжі, особливо в його центральних і південних регіонах, де розорано 70-80% площ. Через надмірну експлуатацію природних ресурсів, інтенсивний розвиток промисловості значно скоротилося біорізноманіття деяких з регіонів. Отже, збереження біорізноманіття на території Лівобережної України має особливе значення [74, 242].

Важливим шляхом збереження генофонду рідких та зникаючих видів і загалом біорізноманіття є введення грибів в штучну культуру та збереження їх у колекціях живих культур, що мають бути базою як для теперішніх і

наступних досліджень видів базидіомікотів, зокрема, як об'єктів біотехнології [76, 215].

Таким чином, завершуючи короткий огляд щодо сучасного стану дослідження властивостей базидієвих грибів та основних напрямків їх використання у сучасній біотехнології, слід наголосити на тому, що біологічно активні речовини, які були виявлені спочатку в плодових тілах дикорослих грибів, продукуються тими ж видами не лише при штучному вирощуванні плодових тіл, але й на стадії росту вегетативного міцелію. Досягнення біотехнології у розробці прийомів культивування грибів зробили можливим створення потужної індустрії промислового грибівництва, а методів виділення біологічно активних речовин грибного походження – відкрили можливість використання грибної сировини для отримання лікувально-профілактичних харчових добавок, функціональних продуктів та лікарських препаратів.

### **1.1.2. Особливості базидієвих грибів, як об'єктів культивування**

Одним із пріоритетних напрямів розвитку мікології є біотехнологічний, а саме розробка технологій з використанням клітин і вегетативних культур базидієвих грибів для отримання біологічно активних речовин, в тому числі і таких, що мають терапевтичні властивості. Це підтверджується результатами досліджень останніх десятиліть, якими доведено, що фармакологічно активні речовини грибів, в порівнянні з продуктами хімічного синтезу, менш токсичні і більш ефективні при застосуванні в медичній практиці. Як результат, розроблені численні технології вирощування та запатентовані формули біологічно активних добавок на основі міцелію вищих грибів [9, 24-26, 197, 201, 211-213, 322, 337, 347].

Наукові основи сучасних технологій штучного культивування їстівних грибів і виробництва посівного міцелію розроблені групою вчених Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України [21-26, 35, 211-213, 337, 242, 347,

361-363]. Створено численну Колекцію культур шапинкових грибів (*Basidiomycota*, *Ascomycota*) – ІВК [215], яка є базою для теперішніх і майбутніх досліджень видів макроміцетів, зокрема, як об'єктів біотехнології. Проведено багаторічні експериментальні дослідження з вивчення розвитку та культурально-морфологічних особливостей їстівних грибів на різних стадіях життєвого циклу, селекції нових вітчизняних високоврожайних штамів цих грибів, добору субстратів, встановлення оптимальних технологічних параметрів вирощування плодових тіл і посівного міцелію, вивчення взаємодії між їстівними грибами та мікроорганізмами, які домінують у субстратах протягом їх ферментації. Встановлено, що біологічно активні речовини містяться не тільки в плодових тілах, а й у вегетативному міцелії грибів, одержуваному шляхом рідкофазового чи твердофазового культивування [21-26, 211-213, 242, 361-363].

Практичне використання грибів у різноманітних галузях потребує постійного пошуку нових штамів різного призначення, який базується на відборі, встановленні особливостей життєвого циклу і характеристик монокаріонів (наприклад, генетичної різноманітності) як одиниці селекції [76].

За складністю організації, вищі базидієві гриби, як об'єкти біотехнології, займають проміжне положення між мікроорганізмами, рослинами і тваринами. Їх життєвий цикл (рис. 1.2.) складається з дев'яти стадій: 1 – проростання базидіоспор; 2 – утворення і ріст гаплоїдного гомокаріотичного міцелію; 3 – злиття протопластів гамет, яке не супроводжується злиттям ядер – плазмогамією; 4 – утворення і ріст фертильного дикаріотичного диплоїдного міцелію з

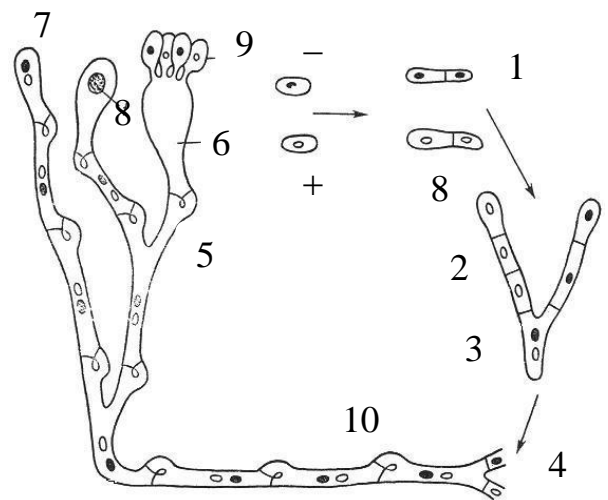


Рис. 1.2. Життєвий цикл вищих базидієвих грибів (схема, позначення стадій – у тексті).

пряжками (10); 5 – формування плодових тіл; 6 – формування гіменію – шару базидій в плодових тілах; 7 – каріогамії – злиття ядер зразу після плазмогамії, яка проходить в базидії; 8 – мейоз, в результаті двох послідовних ділень утворюються 8 гаплоїдних ядер, 4 з яких надходять у 4 базидіоспори, а 4 – дегенерують; 9 – відокремлення екзогенних базидіоспор, які містять 1 (найчастіше) або 2 гаплоїдних ядра [136].

Процес проростання базидіоспор починається з їх набухання в 10-100 разів. Зовнішня оболонка спори розривається і зі спори починає рости гіфа, яка швидко і рясно розгалужується та утворює тонкий первинний міцелій.

Первинний гаплоїдний міцелій – гомокаріон – це міцелій, який розвивається з гаплоїдної спори статевого розмноження і містить тільки генетично ідентичні ядра. Цей міцелій не містить пружок. Таким чином отримують моноспорові культури.

Моноспорові культури висаджені попарно на стерильне агаризоване середовище в чашки Петрі розвиваються як монокаріони, поки не відбудеться їх зустріч з іншим, генетично сумісним міцелієм. Після зустрічі, гіфи двох різних міцеліїв зливаються (3, плазмогамія), а ядра мігрують. Міцелій, який містить ядра різних генотипів називають гетерокаріоном.

Наявність пружок свідчить про утворення дикаріотичного міцелію.

Дикаріон, або вторинний міцелій, є спеціалізованим типом гетерокаріону, в якому два генетично різних гаплоїдних ядра асоційовані в пари у кожній клітині.

Гомокаріон і дикаріон – функціонально відмінні стани в життєвому циклі більшості вищих базидієвих грибів.

Гомокаріон і дикаріон відрізняються у морфологічному плані. Діагностичною особливістю, що відрізняє дикаріотичну гіфу від гомокаріотичної, є пряжка (10), яка присутня тільки в дикаріоні і завжди розташована біля перегородки, оскільки бере участь у поділі клітин. Дикаріон є домінуючою фазою в циклі розвитку базидіомікотів, тільки дикаріотичний міцелій утворює спеціалізовані клітини – базидії, в яких

зливаються ядра і має місце мейоз. Звичайно ці базидії пов'язані зі складно організованими структурами – плодовими тілами. Більшості базидієвих грибів притаманна саме така послідовність розвитку дикаріону, що веде до утворення дикаріотичного міцелію і плодових тіл [89, 136].

Отже, міцеліальні гриби мають загальну властивість: при фізичному контакті міцелію відбувається злиття їх клітин (анастомози гіф, плазмогамія). Оскільки грибні гіфи покриті багат шаровими оболонками, злиттю передують локальне розчинення клітинних стінок. Можливо, ця властивість спочатку виникла внаслідок необхідності злиття вегетативних структур у грибів, що залишилися без гамет. Припускається також, що в основі анастомозів був мікопаразитизм, при якому описані як гаусторіальний, та і негаусторіальний типи злиття.

Встановлено, що анастомози гіф відіграють важливу роль в адаптації грибів до умов оточення. Якщо клітини, що злились містять генетично різні ядра, то при анастомозах вони потрапляють в загальну цитоплазму (явище гетерокаріозису). Мітози забезпечують проліферацію різних алельних станів окремих генів у гетерокаріоні. У грибів з гаплоїдними ядрами гетерокаріозис замінює диплоїдність, так як і у фенотипові гетерокаріотичної клітини, проявляє ті ж алельні співвідношення (домінантні, рецесивні, кодомінантні), що і в гетерозиготній.

Описані уявлення про роль гіфальних взаємодій, які склалися на основі досліджень, що проводились з генетично маркованими лабораторними штамами грибів [76]. Як тільки почалось вивчення великої кількості виділених з природи штамів, виявлялось, що більшість ізолятів при попарному посіві не формують гетерокаріони внаслідок вегетативної несумісності. Оскільки вегетативна несумісність перешкоджає формуванню гетерокаріонів з їх адаптивними властивостями, наявність потужного добору на користь несумісності змусило звернути увагу як на сам феномен несумісності так і на його еволюційні наслідки.

Вегетативна несумісність проявляється при наявності у двох різних



штамів різних генів, які відповідають за несумісність. Таким чином, вона протилежна статевій сумісності, для проявлення якої необхідна гетероалельність за генами сумісності. Тому вегетативну несумісність німецький генетик К. Ессер назвав гетерогенною, а статеву гомогенною [76]. Вегетативна несумісність – широко розповсюджене серед грибів явище, при якому анастомози між гіфами штамів, гетероалельних за визначеними локусами (*het*-локусами), супроводжуються загибеллю клітин, що злилися і тих, які прилягають до них, що перешкоджає взаємному обміну ядрами й елементами цитоплазми. Вегетативна несумісність грибів має всі ознаки, що дозволяють розглядати її як імунну реакцію. Вона є формою впізнавання і відторгнення «чужого» тому, що чим більше в контактуючих штамів гетероалельних *het*-локусів, і, отже чим більше розходження їх геномів, тим сильніше проявляється реакція відторгнення [76, 136]. Популяції багатьох грибів розпадаються на велику кількість вегетативно сумісних (*v* - *c*) груп, що призводить до взаємної ізоляції сусідніх колоній. Напевно, існують якісь фактори, які селекціонують гени вегетативної несумісності і обумовлюють їх накопичення в популяції [136].

Серед гіпотез, які пояснюють екологічну роль вегетативної несумісності, найбільш обґрунтована гіпотеза про захисну функцію – захист від цитоплазматичних елементів, що автономно реплікують. В цитоплазмі у грибів знайдено велику кількість елементів, що автономно реплікують (плазмід, вірусів); деякі з них знижують пристосованість своїх хазяїв, викликаючи такі явища, як гіповірулентність, старіння та інші.

Не один з цих елементів, включаючи покриті білковими капсидами віруси, не здатний заражати гіфи з зовнішнього середовища (апопластно). Відомі лише два шляхи їх розповсюдження в грибних популяціях: вертикальний – через спори від батьків до нащадків та горизонтальний перенос – через анастомози між гіфами двох штамів, що ростуть поряд.

Захистом від вертикальної передачі слугує статевий процес, а захист від горизонтального переносу – цитоплазматична несумісність, так як

ефективність передачі інфекції через зону баражу знижується, або вона не можлива зовсім [76, 136].

Таким чином, аналіз вегетативної несумісності дозволяє судити про розподіл різних, в т.ч. і біосинтетичних властивостей та фенотипічний поліморфізм певних вибірок штамів видів базидіомікотових. Вивчення фундаментальних питань, що пов'язані з явищем сумісності у вищих базидієвих грибів, має також прикладне значення як наукова основа селекції високопродуктивних штамів, які використовуються в біотехнології, та для регуляції взаємовідносин фітопатогенних дереворуйнівних грибів з рослиною-живителем з метою обмеження розповсюдження небезпечних патогенів [76, 136].

## **1.2. Природні антиоксиданти**

### **1.2.1. Класифікація та основні напрямки їх практичного використання**

Дослідженнями останніх років встановлено, що стаціонарність процесу окиснення ліпідів молекулярним киснем є базою, що сприяє підтриманню певного складу, структури та функцій клітинних мембран як високоспецифічних, складних і багатокомпонентних систем. Відносна безпека пероксидного окиснення досягається наявністю антиокислювальних і антирадикальних реакцій, в яких беруть участь антиоксиданти [69, 102, 128]. Отже, в патогенезі більшості захворювань, які визначають великий відсоток смертності та інвалідизації населення (мозкові інсульти, інфаркт міокарда, онкологічні захворювання, гіпертонічна хвороба та інші) важливу роль відіграє порушення процесу вільно-радикального окиснення (ВРО), що приводить до надмірного утворення вільних радикалів, які спричиняють ушкодження мембран і загибель клітин [102, 128, 190, 203, 251, 298, 304, 310-313].

Даний процес умовно поділяють на три етапи: ініціація активних форм

кисню; утворення вільних радикалів жирних кислот; утворення перекисів і гідроперекисів ліпідів – «перекисний етап» [47].

Велику роль в розвитку ВРО відіграє перший етап – ініціальний, тому що він безпосередньо пов'язаний з порушенням метаболізму при патологічних станах і найбільш повно піддається фармакокорекції [102, 128]. Ініціація активних форм кисню (супероксидрадикал -  $O_2^-$ , гідроксилрадикал -  $OH^\cdot$ , аніонрадикал  $O_2^{\cdot-}$  і синглетний кисень -  $O^1$ ) при ряді захворювань може бути викликана певними факторами, такими як використання променевої терапії та інші [47, 69].

Тому в профілактиці та у комплексній терапії захворювань у патогенезі яких має місце активація ВРО, усе більш широке застосування знаходять антиоксиданти [13, 63, 100, 102, 243, 325].

Антиоксидантні засоби – це речовини природного або синтетичного походження, що гальмують вільно-радикальні процеси шляхом впливу на одну або кілька ланок систем утворення активних форм кисню, реактивують антиоксидантні ферменти.

Узагальнюючи дані літератури [47, 69, 100, 102, 128, 415], основні лікарські речовини і препарати з антиоксидантною активністю, відповідно до сучасних уявлень щодо процесів вільно-радикального окислювання, поділяються за механізмом дії на такі групи:

I – Інгібітори основних шляхів утворення активних форм кисню:

- інгібітори ксантинооксидази (алопуринол);
- інгібітори трипсину (гордокс);
- антиадренергічні засоби (пропранолол, анаприлін);
- засоби, які нормалізують порушення окремих ланок вуглеводно-енергетичного обміну (пірацетам, пікамілон, ацетилфосфат, гліцерофосфат, креатинфосфат, амтизол, інтермедіати циклу Кребса (сукцинат, малат, ізоцитрат, тіотриазолін).

II – Інгібітори активних форм кисню:

- інгібітори супероксидрадикалу (супероксиддисмутаза, ерготеїн,

сечовина, тіосечовина, церулоплазмін, нікотинова кислота та її похідні);

- інгібітори перекису водню (каталаза, пероксидаза);
- інгібітори гідроксилрадикалу (манітол, етанол, диметилсульфоксид, альбумін, триптофан, суспензія міді, L-метіонін);
- інгібітори синглетного кисню (гістидин, похідні фенілалкіламінів);

III – Інгібітори вільних радикалів жирних кислот і гідроперекисів ліпідів («прямі» антиоксиданти):

- похідні 6-оксихроманів (α-токоферолу ацетат, α-токоферолу сукцинат, α-токоферолу фосфат, тролокс, вітамін К (вікасол);
- похідні 3-, 6-оксопіридинів, 1, 4-дигідропіримідинів і 1,2-дигідрохінолінів (емоксипін, мексидол, німотоп, сантохін (етоксиквін));
- похідні фенолів і поліфенольні сполуки (іонол, фенозан і його літєві, натрієві та калієві солі, різні поліфенольні рослинні комплекси чебрецю, гвоздики, материнки й інших рослин);
- флавоноїди та їх препарати (фламін, фламікор, кверцетин, рутин, елтон, ЕУТ та інші);
- аліфатичні і ароматичні сірковмісні сполуки (метіонін, унітіол, глутатіон відновлений, ацетилцистеїн, сірковмісні похідні піперидину);
- похідні оксикислот (галова, хлорогенова, кофеїнова, п-оксибензойна, аскорбінова та інші кислоти, галлоаскорбат);
- убіхінони (убіхінон, коензим Q10);
- селеніти (селеніт натрію, Se-метіонінін, Se-глутатіон);
- ретиноли і β-каротини.

IV – Хелатори мікроелементів, особливо металів d-підрівня (трилон Б, купреніл, дисфєрал, унітіол, пектини).

V – Інгібітори фосфоліпаз (хлорпромазин, мєпокрин, антагоністи кальцію (віскєн, ніфєдипін, німотоп), місцеві анестетики (новокаїн і ін.)).

VI – Блокатори циклооксигеназного і ліпооксигеназного шляхів метаболізму арахідонової кислоти (саліцилати, ацетилсаліцилова кислота, індометацин).

VII – Стабілізатори клітинних мембран (фосфоліпіди,  $\alpha$ -токоферолі, пробукол, есенціале, дифеніл-п-фенілендіамін, стероїди, ліпін, насичені жирні кислоти).

VIII – Інгібітори NO-синтетази і пероксинітрилрадикалу (мелатонін, п-нітрофеніл-трет-бутан, цистеїн, N-нітроаргінін, N-метиларгінін).

Враховуючи складність і багатоетапність генезу ВРО, а також участь в ініціальному етапі не одного, а багатьох зв'язаних між собою двосторонніми причинно-наслідковими відносинами факторів вимагають комплексної розробки методів скринінгової оцінки речовин з антиоксидантною активністю, зокрема сполук природного походження.

Запропоновані різні методи первинної оцінки антиоксидантної активності (АОА) сполук у дослідях *in vitro* [32, 69, 100, 334]. Ці методи відзначаються високою специфічністю, не вимагають великих витрат, дають можливість одночасного скринінгу великої кількості речовин. За механізмом ініціювання ВРО вони підрозділяються на три групи:

- методи оцінки антиоксидантної активності при ферментативному і неферментативному ініціюванні ВРО,
- методи оцінки АОА за інгібуванням активних форм кисню та
- методи оцінки АОА за інгібуванням окису азоту.

Відібрані після первинного скринінгу сполуки, надалі піддаються дослідженням на експериментальних моделях патології (ішемії мозку, серця, печінки тощо). Інтенсивність процесів ВРО при патологіях оцінюють за накопиченням початкових, проміжних і кінцевих продуктів цього процесу: дієнових кон'югатів, трієнкетонів, малонового діальдегіду, а стан антиоксидантної системи – за активністю супероксиддисмутази, каталази, глутатіон-пероксидази і  $\alpha$ -токоферолу [69, 100].

Відповідні дослідження активно проводяться в нашій країні і за

кордоном серед різних класів хімічних речовин – селено-, сірковмісних аліфатичних, ароматичних і гетероциклічних сполук, комплексоутворювачів, нативних ферментів тощо. Нині пошук антиоксидантних засобів проводиться серед різних класів сполук природного походження. Відомо, що антиоксидантну активність проявляють каротини, убіхінони, флавоноїди, оксикислоти та інші сполуки [100]. Крім цього, високу антиоксидантну активність виявляють поліфенольні рослинні комплекси, отримані з чебрецю, гвоздики, материнки та інших лікарських рослин [69, 100].

Аналіз даних наукової літератури і патентів свідчить, що найбільш перспективним напрямом у цілеспрямованому пошуку і створенні високоефективних антиоксидантних засобів є дослідження серед різноманітних ароматичних і гетероциклічних сполук, які здебільшого реалізують антиоксидантний ефект на ініціальних етапах ВРО. Останнім часом з'явилися публікації про наявність такої активності серед фенілалкіламінів, бензофуранів, антрахінонів, хромонів, тріазолів, піридинів, піримідинів, хінолінів, хіназолінів, акридинів, ксантинів, теофілінів та ін..

Насамперед, більшість цих сполук визначає структурна спорідненість до природних фізіологічно активних речовин, що обумовлює їх порівняно низький рівень токсичності і широкий спектр біологічної дії. Багато сполук містять структурні фрагменти, що мають спорідненість до активних центрів антиоксидантних ферментів і ферментів електронно-транспортного шляху.

Перспективним вважається пошук антиоксидантів серед речовин, які мають структурні фрагменти і функціональні групи, що проявляють окисно-відновні властивості, для яких характерна таутомерія, а також здатність вступати в реакції комплексоутворення [129].

Доведено, що антиоксиданти також можуть використовуватись в ролі інгібіторів процесів окислювання лікарських препаратів, оскільки однією з причин псування фармацевтичних та харчових продуктів є процес окислювання, який призводить не тільки до зниження якості, але й до руйнування фізіологічно цінних компонентів, а в ряді випадків і до

утворення токсичних сполук. Особливо чутливі до окислювання ненасичені жири та олії, вітаміни, сполуки з альдегідними і фенольними групами [69, 100].

Антиоксиданти, як правило, в хімічному відношенні являються реакційноздатними, тобто вони можуть вступати у взаємодію з активними інгредієнтами і впливати на стійкість та ефективність лікарських препаратів і харчових продуктів, що потребує критичного підходу до всіх компонентів, які входять до складу фармацевтичних та харчових продуктів. Рецептūra лікарського препарату повинна бути науково обґрунтованою, в зв'язку з чим АО, які застосовуються у фармацевтичній та харчовій промисловості, повинні задовольняти певним вимогам [415].

У фармації, поряд з жирами та оліями, процесам окислювання часто піддаються і біологічно активні речовини (адреналін, апоморфін, морфін тощо), що входять до складу лікарської форми для парентерального введення. Фенольні АО, прийняті в харчовій промисловості, непридатні для запобігання окислювання вказаних сполук через дуже низьку розчинність у воді. АО розподіляються на розчинні у воді та розчинні в оліях. Перші використовуються в гідрофільних системах, другі – в ліпофільних.

Посилення інгібуючої дії окислювання може бути досягнуте сумісним використанням декількох речовин. Концентрації АО та синергістів можуть бути змінені у вказаних межах в залежності від тієї лікарської форми, в яку вони закладаються. Як правило, це визначається дослідним шляхом, а введення антиоксидантів до складу лікарських препаратів та харчових продуктів значно підвищує їх стабільність і тим самим покращує якість [415].

Таким чином, сучасні тенденції вибору комплексної патогенетичної терапії потребують включення лікарських засобів, що сприяють загальній нормалізації або стабілізації системи гомеостазу, а антиоксидантні засоби є необхідними компонентами комплексної фармакотерапії [69, 100]. Застосування антиоксидантів у виробництві лікарських препаратів та харчових продуктів відкриває можливість значного підвищення їх

стабільності і, тим самим, покращення якості. Все це робить актуальним пошук як ефективних антиоксидантних сполук, так і їх організмів-продуцентів.

### **1.2.2. Антиоксиданти рослинного походження та стан дослідження антиоксидантних властивостей базидієвих грибів**

Антиоксиданти як захисні фактори біологічних систем вже досить тривалий час досліджуються у світовій науці [69, 415]. Встановлено, що в ході обмінних процесів у клітинах організму відбувається утворення вільних радикалів, що у надмірній кількості впливають на розвиток патологічних явищ [17, 32, 69]. Значна частина цих радикалів утворюється в результаті функціонування окисно-відновних ферментів, що призводять до появи супероксидів, здатних ініціювати ланцюгові хімічні реакції в різноманітних органах клітини [17, 100]. Припущення про це одним із перших, ще у 1963 році висловив академік Н.М. Емануель, що рекомендував використовувати інгібітори «радикальних реакцій» для захисту «біологічних систем» від шкідливого впливу процесів пероксидації [17, 32, 58].

У сучасній практичній медицині з метою пригнічення вільнорадикального окислювання (ВРО) в тканинах організму, яке виникає внаслідок ланцюгової реакції при взаємодії пероксидного радикалу сполуки з новою молекулою органічної сполуки, використовується великий арсенал антиоксидантів – синтетичних та рослинного походження [325].

Механізм дії АО полягає у взаємодії їх з продуктами та ініціаторами ПОЛ, тобто з радикалами R, ROO, з активними формами кисню, гідропероксидами жирних кислот, каталізаторами пероксидного окислювання - іонами металів змінної валентності [17], результатом чого є гальмування процесів ферментативного і неферментативного ПОЛ.

Дослідженню статусу АО присвячені численні роботи науковців, але клінічна фармакологія його вивчена ще недостатньо. Експериментально



доведено, що тривале використання АО синтетичного походження призводить до небажаних побічних наслідків, тому протягом останніх десятиліть дослідники зайняті пошуком природних антиоксидантних речовин у представників рослинного і тваринного світу [58, 69].

Найбільш вивченими природними речовинами з антиоксидантною активністю вважаються ізомери токоферолу, жиророзчинний вітамін Е, що у різному ступені виявляють свої властивості тільки в ліпідних фракціях тканин [69]. Серед водорозчинних інгібіторів вільнорадикальних реакцій помітне місце займають фенольні сполуки, здатні, у силу особливостей хімічної будови легко вступати в обмінні процеси, створюючи неактивні радикали [27].

Існує думка, що синтетичні феноли легко піддаються автоокисненню з утворенням нових вільних радикалів, що викликають ушкодження клітин, у зв'язку з чим їхнє застосування рекомендується обмежити [27].

Тому особливе значення набув пошук нових природних водорозчинних АО, тим більше, що в багатьох країнах уведено суворі обмеження на використання синтетичних добавок-стабілізаторів, зокрема – до харчових продуктів [415].

Експериментальні дослідження значною мірою розширили уявлення про натуральні речовини і лікарські засоби, які мають АОО. Вони показали, що серед природних сполук особливо високою АОО характеризуються різноманітні групи дубильних речовин, що вже знайшло своє практичне застосування [100, 128]. Так, наприклад, ізомери катехіну, виділені з листа зеленого чаю і виноградних кісточок, додаються до харчових продуктів і косметичних виробів. Для цих же цілей використовується гідролізат галютаніну із стручків ріжкового дерева (*Ceratonia*) родини бобових, екстракти кори і гілок берези (*Betula*), евкаліпта (*Eucalyptus*) і ін., процианідини, виділені з лубу хвойних порід дерев. У якості стабілізаторів забарвлення антиоксидантів у напоях і кондитерських виробках застосовуються складні композиції, що складаються з флавоноїдних

глікозидів, аліфатичних кислот, їхніх солей, декстрину й інших речовин [100, 128].

Проводилося вивчення АОА багатьох інших класів рослинних речовин. Зазначена активність показана для стеролів і аліфатичних кислот – лимонної, яблучної, фумарової, молочної, фітинової, абсцизової. Розглянуто також АО властивості ферментів, білків, алкалоїдів, вітамінів і терпеноїдів [175, 263], і для підвищення водорозчинності ряду ліпофільних АО було запропоновано одержувати сполуки на основі циклодекстринів [100, 128].

Серед об'єктів, що мають інтерес у якості джерела одержання АО, можна виділити групу сільськогосподарських і харчових рослин, у тому числі й відходи їхньої переробки [102, 325].

На думку О.В. Мироник, антиоксидантна дія препаратів рослинного походження зумовлена наявністю в них БАР, зокрема біофлавоноїдів, що зменшують кількість вільних радикалів і продуктів перекисного окислювання ліпідів [102]. Застосування таких фітопрепаратів у комплексному лікуванні хвороб надзвичайно перспективне з огляду на їх м'яку, нетоксичну і поступову дію та здатність активувати антиоксидантну систему організму. Крім того, застосування біофлавоноїдів рослинного походження стимулює синтез нуклеїнових кислот і білків, відновлення тіолових груп білків, ферментів тощо. Це відбувається завдяки взаємодії флавоноїдів з вільними радикалами, наслідком чого є утворення семіхінового радикалу з малим запасом енергії, нездатним продовжувати ланцюговий вільнорадикальний процес.

Окремі автори [100, 128] вважають, що для зниження концентрації кінцевих продуктів ПОЛ – малонового діальдегіду і проміжних продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів необхідно використовувати флавоноїдні препарати (флавіон, кверцетин, лутеолін), що відіграють роль "пастки" для вільних радикалів. Цьому класові речовин притаманні протизапальні, протинабрякові, протипроменеві, спазмолітичні, анальгезуючі, противиразкові властивості [102].

Проведений аналіз літератури показує, що багато як досить поширених, так і специфічних природних сполук, мають властивості пригнічувати процеси утворення вільних радикалів і пероксидації в клітинах або в розчинах лабільних речовин. Наголосимо на результатах численних досліджень, в результаті яких встановлено, що найвищу антирадикальну властивість мають лише фенольні форми АО рослинного походження [100, 102, 128]. Розмаїтість відкритих хімічних структур дозволить вибрати найбільш прийнятну для кожного варіанта практичного застосування речовину або групу речовин. При цьому можна врахувати спорідненість даного похідного до метаболічних процесів, що відбуваються в організмі.

Можна цілком погодитись з думкою багатьох авторів і про те, що зважаючи на ефективність використання біоантиоксидантів в медицині та перспективи їх застосування в харчовій і інших галузях промисловості і сільського господарства, цілком виправданими та актуальними є подальший широкий скринінг організмів – потенційних джерел антиоксидантних речовин.

Як показали низка досліджень [3, 17, 102], численні організми, включаючи гриби, можуть нормально розвиватися в присутності  $\text{H}_2\text{O}_2$  у концентрації до 1%. Ця властивість грибних організмів дозволяє їм освоювати всілякі екологічні ніші. У зв'язку із цим встає питання, які ж системи в грибній клітині забезпечують стійкість до дії різних несприятливих факторів.

З іншого боку, гриби застосовуються для одержання широкого кола біологічно активних сполук, і ефективність біотехнологічних процесів безпосередньо пов'язана з метаболічною активністю продуцентів. Тому вивчення антиоксидантного захисту (АОЗ) і шляхів його регуляції в клітинах грибів є актуальним напрямком досліджень.

Встановлено, що активні форми кисню (АФК) в грибній клітині виникають при залученні  $\text{O}_2$  в метаболічні процеси, при дії зовнішніх чинників, а також в результаті функціонування специфічних ферментних

систем. АФК з одного боку ушкоджують клітини, а з іншого – викликають диференціювання у грибів. Зміна фаз розвитку відбувається через нестійкий гіпероксидантний стан, обумовлений підвищенням рівня АФК у клітинах, тобто як і у всіх інших організмів АФК здатні відігравати роль вторинних месенджерів, що регулюють онтогенез грибів [8, 60].

У ряді робіт показано, що у грибів наявна безліч різних шляхів детоксикації АФК, які забезпечують захист клітин від ушкодження цими радикалами та обумовлюють тривалість життя грибного організму. Зі станом компонентів антиоксидантного захисту клітини тісно пов'язана її стійкість до факторів навколишнього середовища. Система АОЗ включає в себе як ферменти – СОД, каталазу, гемвіміні і тіолові пероксидази, так і антиоксиданти, представлені глутатіоном, аскорбатом, пігментами (каротиноїди, меланіни та інші), фенольними сполуками, проліном [102].

Велике значення для запобігання окисного стресу мають зміна клітинної поверхні в результаті агрегації клітин, а також синтезу унікальних грибних білків – гідрофобінів. Переміщення токсичних сполук у вакуолі, хелатування металів, системи репарації клітини та інші механізми також підвищують стійкість грибів до окислювального стресу. Активність компонентів АОЗ змінюється в процесі онтогенезу і залежить від дії зовнішніх факторів [102].

Вивчення стратегії антиоксидантного захисту у грибів показало, що редокс-стан тіолів безпосередньо пов'язаний з окислювально-відновним статусом клітин і визначає у ній конформацію редокс-чутливих білків. Утворення внутрішньо- і міжмолекулярних дисульфідних зв'язків у присутності АФК, а також оборотність цих реакцій при зміні рівня активності оксидантів лежить в основі рецепції і трансдукції сигналу АФК, а також пост-трансляційних змін конформації та активності ферментів, що викликають зміну фізіологічного стану клітин (наприклад, зниження активності ферментів гліколізу та синтезу білка, що пов'язане із зупинкою росту). Геномні та протеомні дослідження АОЗ і, зокрема, тіолових сполук

проведені в основному на клітинах дріжджів. Останнім часом з'явилися аналогічні роботи і на культурах міцеліальних грибів [63, 406]. Ці дослідження мають велике значення, оскільки в процесі промислового культивування клітини піддаються дії різноманітних стресів, у тому числі і окисного стресу [86, 377, 387].

Підсумовуючи вищесказане, слід зазначити, що у грибів є безліч різних джерел АФК і шляхів їх детоксикації, що забезпечують захист від шкідливої дії АФК і дозволяють підтримувати необхідний рівень цих сполук для виконання ними сигнальної функції. Регулювання АОЗ засноване на редокс-залежній трансдукції сигналу АФК і модуляції експресії генів. Величезну роль у редокс-залежній модифікації білків, що беруть участь у трансдукції сигналу, виконують тіолові пероксидази (глутатіонпероксидази, тіоредоксини, глутаредоксини, пероксиредоксини, сульфїредоксини) і глутатіон [28, 388].

На прикладі деяких представників класу *Deuteromyces* та неідентифікованих ґрунтових мікроміцетів показано, що ці гриби також здатні продукувати високоактивні біоантиоксиданти [28].

Так, у роботах А.Н. Шивріної і співробітників [179] показано, що при рості на середовищах з березовою тирсою деякі ксилотрофні базидіомікоти продукують гуміноподібний комплекс, який близький за своїм складом до так званої чагової кислоти, з якою пов'язують лікувальну дію екстракту чаги. Природно було припустити, що внесення до живильних середовищ і інших лігнінвмісних компонентів може сприяти накопиченню фенольних сполук, які мають антиокисну активність, як в міцелії ксилотрофних базидіомікотів, так і в культуральній рідині.

В тому ж році В.А. Соловйов і А.М. Кутневич виказали припущення, що лікарські властивості *Inonotus obliquus* – чаги, що здавна використовується у народній медицині, пов'язані з її здатністю впливати на протікання вільнорадикальних реакцій в організмі людини [86, 213]. Автори вважали, що механізм її дії заснований на стимуляції окисних

вільнорадикальних реакцій.

Результати подальших досліджень, зокрема А.Н. Капича та Л.Н. Шишкіної свідчать про те, що як водні екстракти чаги так і її ліпідні фракції мають високу АОА. Отже, терапевтична дія екстрактів цього гриба, більш вірогідно, обумовлена їх здатністю гальмувати вільнорадикальні реакції. Це дозволяє, на думку авторів, рекомендувати використання чаги для профілактики тих патологічних станів, які пов'язані з активацією процесів ПОЛ [82-84, 180, 283-285].

Як зазначають А.Н. Капич та Л.Н. Шишкіна [180, 283], особливий інтерес, як потенційні джерела антиоксидантних речовин, представляють базидієві гриби і особливо дереворуйнівні базидіомікоти, окремі види яких, як відомо, здавна використовуються в народній медицині для лікування різноманітних захворювань [242, 328, 382]. Ними було вивчено антиоксидантні властивості 12 видів дереворуйнівних базидієвих грибів при різних умовах окислювання.

В якості об'єктів дослідження вони використовували міцелій ксилотрофів білої гнилизни – *Trametes versicolor* (L.: Fries). Pilt., *Fomes fomentarius* (L.) Gill., *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *Panus tigrinus* (Bull.: Fr.) Sing., *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm. та бурої гнилизни – *Fomitopsis pinicola* (Fr.) Karst., *Gloeophyllum sepiarium* (Wulfen) P., *Laetiporus sulphureus* (Fr.) Murr., *Leucogyrophana pinastri* (Fr.: Fr.) Ginns et Weresub, *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst., вирощений в глибинній культурі на глюкозо-пептонному живильному середовищі, плодові тіла *Panus tigrinus* і нарости, утворені грибом *Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pil. на березі – чагу.

Порівняльний аналіз отриманих результатів показав, що гриби білої гнилизни мають потенційно більш виражені антиоксидантні властивості. Разом з тим, ліпіди цих грибів характеризуються прооксидантними властивостями. Скоріше за все, це пов'язане з перевагою у їх складі ненасичених жирних кислот і, в першу чергу, лінолевої кислоти, що окислюються швидше метилолеата. Таким чином, можна говорити про

баланс антиоксидантних і прооксидантних систем, які забезпечують протікання процесів ПОЛ у грибів на певному стаціонарному рівні, який потенційно вищий у грибів білої гнилизни деревини [8, 82].

Відомо, що в біодеградації лігніну ксилотрофними видами базидіомікотових велике значення мають реакції вільно-радикального окислювання [84, 249, 288].

Порівняльна оцінка здатності 25 видів ксилотрофних базидієвих грибів порядків *Aphyllorphorales* та *Agaricales* до утворення речовин, які мають антиокислювальну активність, при рості на напівсинтетичному живильному середовищі та живильних середовищах з лігнінвмісними компонентами показала, що ксилотрофні базидіоміотові різних фізіологічних груп суттєво відрізняються за своїми антиокисними властивостями [84]. Екстракти міцелію лігнінруйнуючих грибів проявили більш високу АОА, у порівнянні з целюлозоруйнуючими грибами. Внесення у живильні середовища для культивування ксилотрофних базидієвих грибів лігнінвмісних компонентів по-різному впливало на їх здатність до утворення антиоксидантів в залежності від видової і штамової приналежності [84].

Рослинна біомаса – відновлюваний та найбільш поширений субстрат для росту грибів в природі та для культивування їх у штучних умовах. Вона щорічно накопичується в величезних кількостях і за енергопотенціалом в декілька раз перевищує світову здобич нафти, газу і вугілля. Механізм розщеплення одного із компонентів рослинних субстратів – целюлози вивчено. Що стосується лігніну, то всі запропоновані схеми його утилізації мають гіпотетичний характер. Вважають, що поряд з ферментами на перших етапах його деградації приймають участь різноманітні форми активованого кисню. Одним із шляхів утворення синглетного кисню можуть бути реакції вільнорадикального або перекисного окислювання ліпідів [192, 249].

Згідно сучасним уявленням, в клітинах міцеліальних грибів, як і інших біологічних об'єктів, постійно підтримується динамічна рівновага в системі перекисне окислювання ліпідів – антиоксидантна активність. Ця рівновага

визначає антиоксидантний статус організму [283].

Під впливом низки факторів, в тому числі і стресових дій, порушується баланс процесів ПОЛ-АОА. Інтенсифікація процесів ПОЛ супроводжується утворенням високоактивних ліпідних радикалів, які приймають участь в атаці на лігнін. Таким чином, вільнорадикальне окиснення лігніну, що ініційоване лігнолітичними ферментами, може суттєво посилюватись пероксидними радикалами ліпідів. З іншої сторони, як результат порушення в системі ПОЛ-АОА на певних стадіях стрес-реакції можлива гіперпродукція речовин, що виконують функцію антиокисників і захищають клітини від надлишкового утворення продуктів ПОЛ [190, 384].

Дослідження, проведені В.Г. Бабицькою і співр. [8-9, 196-200] з вивчення антиоксидантної активності 4 видів грибів класу *Deuteromycetes* (*Chaetomium setosum*, *Penicillium verruculosum*, *Alternaria alternate*, *Aspergillus carbonarius*) і 4 видів грибів відділу *Basidiomycetes* (*Pleurotus ostreatus*, *Crinipellis schevczenkovi*, *Coriolus hirsutus*, *Tyromyces lacteus*) – деструкторів лігноцелюлозних субстратів також виявили суттєві відмінності в деградації лігніну грибами 2-х екологічних груп: під дією ксилотрофів молекулярна маса лігнінів зменшувалася майже в два рази, а під дією сапротрофів – незначно. Ксилотрофи більш активно деметоксилювали і окиснювали лігнін, мали більш високий рівень антиоксидантної активності. Порівняльний аналіз антиоксидантної і деструктивної здатності грибів дозволяє з одного боку, рекомендувати використання антиокисної активності в якості одного з критеріїв відбору грибів – деструкторів лігніну, а з другого – привертає особливий інтерес до дослідження синтезу грибами ключового антиоксидантного ферменту – каталази, яка приймає участь у елімінації активних форм кисню, що генеруються грибами. Дослідження В.Г. Бабицької і співробітників показали, що базидіальні гриби, зокрема ксилотрофні, характеризуються більш високою активністю цього ферменту у порівнянні з грибами інших систематичних груп [8-9]. Але ці висновки зроблені на обмеженій кількості видів і потребують більш детального



експериментального дослідження.

Останні десятиріччя ознаменувалися стрімким розвитком напрямку досліджень – вивченням антиоксидантної активності грибів. Встановлено, що найбільш значну антиоксидантну активність на цілому ряді тест-систем мають екстракти з плодових тіл та міцелію *Pleurotus ostreatus* та менш відомого *Hypsizygus marmoreus*, який поряд з цим гальмував і розвиток метастазів карциноми [348, 361]. Антиоксидантна активність спиртових екстрактів грибів може бути одним з пояснень полегшення стану хворих, які їх вживають після променевого лікування онкозахворювань.

Дослідженню антиоксидантних властивостей неїстівних афілофоральних грибів присвячена низка повідомлень, зокрема це стосується екстрактів з міцелію *Laetiporus sulphureus*, *Ganoderma lucidum* і *Trametes versicolor* та інших видів [211, 231, 282, 312].

Екстракти з *Agrocybe cylindracea* (*aegerita*), *Inonotus obliquus* та деяких інших грибів мають терапевтичну активність, яка обумовлена наявністю в грибах ряду низькомолекулярних сполук АО дії. Зокрема, антиоксидантну активність пов'язують з вмістом ерготіонеїну (*ergothioneine*; рис. 1.3.) – надзвичайно стабільного природного антиоксиданту з унікальними властивостями [361-363].

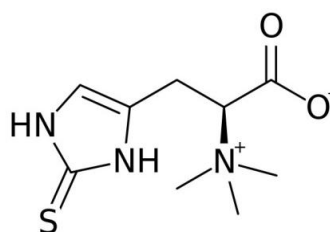


Рис. 1.3. Структурна формула ерготіонеїну.

Отже, детальне вивчення терапевтичної дії лікарських грибів показує, що їх фізіологічна дія значною мірою може бути обумовлена наявністю в їх складі антиоксидантних сполук та збалансованістю у системі прооксиданти – антиоксиданти. Проте, дані щодо АОА базидіомікотових уривчасті та базуються на результатах дослідження цих властивостей хоча і великої

кількості штамів з застосуванням різних методів, бракує систематичних досліджень щодо виявлення зв'язку антиоксидантних властивостей біологічно активних сполук цих грибів з їх лікарською дією.

Проведений С.М. Бадалян та співробітниками попередній АОА-скринінг міцелію 15 видів базидіомікотових виявив наявність різного рівня цієї важливої фізіологічної активності у більшості досліджених грибів. Автори відзначають високу ступінь інгібування процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) під дією культуральної рідини видів грибів *Pholiota alnicola*, *Lepista alnicola*, *L. personata*, *Trametes versicolor*, *Volvariella bombycina*, *Stropharia coronilla*; а також високий рівень АОА зразків міцеліальної біомаси видів грибів *Volvariella bombycina* та *Lepista personata* [201-204].

Антиоксиданти грибного походження, так само, як і АО іншого походження, можуть використовуватися в різних галузях народного господарства та медицини і у косметології [11, 12].

Крім того, наявність антиоксидантних речовин в їстівних грибах має велике значення при вирішенні питань використання їх для отримання продуктів і препаратів лікарсько-профілактичного призначення [8, 11, 26, 60, 211, 220-224, 379].

Висновки базуються на результатах дослідження обмеженої групи штамів базидіомікотових, не вивчалася динаміка та закономірності їх АОА. Отже, для виявлення активних продуцентів біоантиоксидантів, мають бути продовжені дослідження із залученням більшої кількості видів і штамів грибів.

Таким чином, можна цілком погодитись з думкою багатьох авторів про те, що пошук нових природних антиоксидантів грибного походження є актуальною і перспективною задачею сучасної біотехнології і мікофармакології, а результати цих досліджень дозволять знайти нові джерела антиоксидантів з метою їх впровадження у виробництво продуктів харчування, медичних препаратів і косметичних засобів.

### **1.3. Біологічне значення та біотехнологічні аспекти процесів перекисного окиснення ліпідів**

Інтерес до питань перекисного окиснення ліпідів у біологічних мембранах різко зріс у самий останній час, свідченням чому служать численні публікації в самих різноманітних біологічних і медичних періодичних виданнях. Усього декілька років тому вивчення ланцюгових реакцій перекисного окиснення жирних кислот являли собою як би незначні відгалуження від різноманітних галузей науки, що достатньо далеко віддалені одна від одної. У хімічній кінетиці, у проблемах харчової промисловості, в окремих питаннях патології, токсикології, радіобіології, біохімії, біофізики тощо, зустрічалися розрізнені дослідження, присвячені перекислому окислюванню ліпідів, але жодне з них, узятє окремо, відносилось як би до окремого випадку, другорядному в масштабах кожної із перерахованих наук. Але, в міру накопичення фактів ставало усе більш очевидним, що вивчення вільнорадикального ланцюгового окислювання ненасичених жирних кислот у клітині саме по собі є важливою науковою проблемою, що знаходиться в точці перетинання цілого ряду суміжних дисциплін [17, 32, 47, 60, 86].

Насамперед проблема ПОЛ у біологічних мембранах знаходиться, як і взагалі біологія мембран, на рубежі між біохімією і біофізикою. Біохімічні методи виділення субклітинних часток, ензимологічного контролю, так само як і аналізу продуктів перекисного окиснення, знаходять важливе доповнення в біофізичних методах вивчення вільнорадикальних процесів, серед яких у даному випадку найбільше плідним виявився вимір хемілюмінесценції, що супроводжує ці процеси. Біохімічна концепція метаболізму, регульованого рядом чинників, включаючи ензими, доповнюється біофізичними категоріями реакцій вільних радикалів у біомолекулярній структурі біологічних мембран.

Вивчення процесів ПОЛ зблизило і дві інші науки: хімічну кінетику і

патологію. Як і у випадку інших органічних сполук, перекисне окиснення ліпідів підпорядковано кінетичним закономірностям, характерним для ланцюгових реакцій, що вивчені на об'єктах, далеких від біології, скажемо, на прикладі рідкофазного окиснення циклогексану або кумолу. Але з іншого боку, поява перекисів у тканинах є одним із важливих факторів дії агентів (наприклад, радіації, отрут або авітамінозу), що ушкоджують компоненти клітин і мембран. Поки вивчення кінетики ведеться на прикладі вуглеводнів, а вивчення патології – на рівні цілого організму, між цими двома напрямками немає реального зв'язку. Але, при переході досліджень на рівень розчинів і суспензій ліпідів, біологічних мембран або органел кінетика і патологія стає причиною і наслідком одних і тих самих молекулярних подій [47].

Нарешті, процеси перекисного окиснення служать предметом інтересу молекулярних біологів і лікарів. Сенсаційні відкриття, зроблені в останнє двадцятиліття в області молекулярної біології, дозволяють сподіватися на вирішення основних проблем теоретичної медицини та застосувати досягнення біологічної науки до вивчення кожного конкретного захворювання. Але при такому підході ми використовуємо не стратегію, а лише зброю сучасної біології. Тим часом, найважливіша теза молекулярної біології полягає в тому, що основні процеси клітинної життєдіяльності, наприклад, біосинтез білка, реплікація ДНК або окисне фосфорилування, йдуть у принципі однаково не тільки в клітинах того самого організму, але й у клітинах цілком різних організмів, наприклад бактерій і людини. Чи не означає це, що в основі ушкодження, хвороби і загибелі теж повинні бути якісь загальні для всіх клітин універсальні процеси субклітинної і клітинної патології? Очевидно, ушкодження мембран клітин і клітинних органел – це один із таких універсальних патологічних процесів. У свою чергу серед причин порушення мембран не на останньому місці стоїть перекисне окислювання мембранних фосfolіпідів. Втім, і в нормальній життєдіяльності клітин процесам перекисного окиснення безумовно належить певна роль.

Отже, питання перекисного окиснення ліпідів знаходяться як би на

пересіченні інтересів біохіміків і біофізиків, хімічних кінетиків і патологів, біологів і лікарів. Безпосереднім результатом цієї обставини явилася велика різноманітність публікацій в області перекисного окиснення, пов'язана з різноманітністю використовуваних об'єктів дослідження (від розчинів жирних кислот до цілих органів), методів (від хроматографії до виміру надслабких випромінювань), а також і професійного фаху дослідників (від хіміків-кінетиків до лікарів-клініцистів).

Певною мірою вже знайшли вагомі підтвердження три ідеї, висунуті для розгляду наприкінці минулого століття [47].

По-перше, процес перекисного окиснення – не випадок і не виняток, а досить поширене явище, що постійно відбувається в тій або іншій мірі в будь-якій живій клітині й у різноманітних мембранних структурах, хоча і з невеликою швидкістю.

По-друге, вивчення механізму цього процесу показує, що це – типова ланцюгова реакція з характерної для ланцюгових реакцій кінетикою. Головним регулятором процесу в модельних експериментах є іони негемінового заліза, потім з'єднання, що впливають на валентність і стан цих іонів, і, нарешті, ліпідні антиоксиданти. Можна припустити, що й у клітині регуляція перекисного окиснення йде за участю тих же з'єднань.

Нарешті, здається ймовірним, що при всьому різноманітті ефектів, які викликаються продуктами ПОЛ на клітину, найбільш важлива їхня дія – це вплив на проникність біомембран. Тому не виключено, що ПОЛ або близький до нього механізм приймає певну участь у регуляції транспорту речовин через мембрани. Порушення цього механізму, очевидно, і лежить в основі багатьох патологічних процесів [47, 283].

Найбільшою мірою роль і особливості протікання процесів ПОЛ вивчені в людини і тварин. Усе більше з'являється робіт про значення ПОЛ у життєдіяльності рослин. Що стосується мікроорганізмів та грибів, то вони в цьому відношенні залишаються практично не дослідженими. Водночас, передбачається, що ПОЛ може відігравати важливу роль у різноманітних

природних процесах, здійснюваних мікроорганізмами, наприклад, в окисній трансформації різноманітних сполук, біолюмінесценції й ін. [110, 137].

Особливе місце серед грибів займає група ксилотрофних базидієвих грибів, яким належить ключова роль у круговороті речовин і потоку енергії в лісових екосистемах. Останнім часом проводяться масштабні дослідження, спрямовані на вивчення механізмів розщеплення лігніну ксилотрофними базидіомікотовими, оскільки передбачається, що пізнання цих механізмів може відкрити шляхи для розробки екологічно чистих, енергозощадних біотехнологій переробки лігноцелюлозної сировини [92, 283]. Загальновизнано, що деструкція основних компонентів деревини – целюлози і лігніну – відбувається в природі головним чином під дією позаклітинних ферментів грибів, зокрема ксилотрофних базидієвих грибів. Водночас встановлено, що руйнація лігніну деревини є результатом реакцій вільно-радикального окислювання і супроводжується утворенням активних форм кисню [110, 303]. Поряд із цим, є експериментальні дані про спроможність ксилотрофних базидіомікотових утворювати високоактивні кисневі радикали, які, як вважають, можуть викликати деструкцію лігніну і целюлози [284]. Оскільки вільні радикали мають також здатність ініціювати перекисне окислювання різноманітних компонентів клітини, і, в першу чергу ліпідів, важливою представляється оцінка можливості протікання процесів ПОЛ і їх регуляції в вегетативному міцелії ксилотрофних базидієвих грибів.

Відомо, що характерною рисою ліпідів міцелію ксилотрофних базидієвих грибів, що руйнують лігнін, є високий вміст поліненасичених жирних кислот, головним чином лінолевої кислоти, причому в складі фосфоліпідів (ФЛ) мембран її вміст складає більш 80%.

ФЛ ксилотрофних базидієвих грибів представлені лізофосфатиділхоліном, сфінгомієліном, фосфатидилхоліном, фосфатидилінозитом, фосфатидилсеріном, фосфатидилетаноламіном, фосфатидилгліцеріном, кардіоліпином і фосфатидною кислотою. Володіючи Ксилотрофні базидієвих грибів відрізняються від грибів інших

таксономічних і екологічних груп кількісним співвідношенням окремих сполук, що входять до складу ФЛ. Істотною особливістю грибів білої гнилизни є переважання в їхньому складі легкоокислювальних фракцій фосфатидилетаноламіна, кардіоліпіна і фосфатидилгліцерина. Це, очевидно, безпосередньо пов'язане з високим ступенем ненасиченості загальних ліпідів, що в сукупності створює сприятливі передумови для протікання в міцелії процесів ПОЛ.

Прооксидантні властивості ліпідів міцелію ксилотрофних базидієвих грибів були продемонстровані на метилолеатній окисній моделі [190, 285].

Крім того, уперше встановлено [162], що ксилотрофні базидієві гриби утворюють високоактивні ліпоксигенази, що окислюють лінолеву кислоту з утворенням гідроперекисів і ініціюючи ферментативне ПОЛ. Прямі виміри вмісту продуктів ПОЛ, що реагують із тіобарбітуровою кислотою (ТБК-АП) і дієнових кон'югатів у міцелії деяких ксилотрофних базидієвих грибів, а також активності ліпоксигеназ показали, що між цими показниками є прямий взаємозв'язок. Таким чином, доведено, що в міцелії ксилотрофних базидієвих грибів мають певну інтенсивність процеси ПОЛ.

На підставі порівняльного вивчення складу ліпідів, активності процесів ПОЛ і систем їхньої регуляції у ксилотрофних базидієвих грибів білої і бурої гнилизни сформульоване уявлення про більш активне протікання процесів ПОЛ у міцелії лігнінруйнівних грибів. Розроблено гіпотезу про поєднання процесів ПОЛ у ксилотрофних базидіомікотових із руйнацією лігніну за механізмом вільно-радикального окиснення. У основі цієї гіпотези лежить ідея про розщеплення лігніну у результаті спільної дії лігнінолітичних ферментів і пероксидних радикалів ліпідів міцелію.

Суть гіпотези, схематично представленої на рис. 1.4, зводиться до наступного [84, 284].

У процесі росту під впливом різноманітних чинників, наприклад, при дефіциті джерел азотного живлення, культури грибів переходять у ідіофазу, сполучену з початком автолізу міцелію.

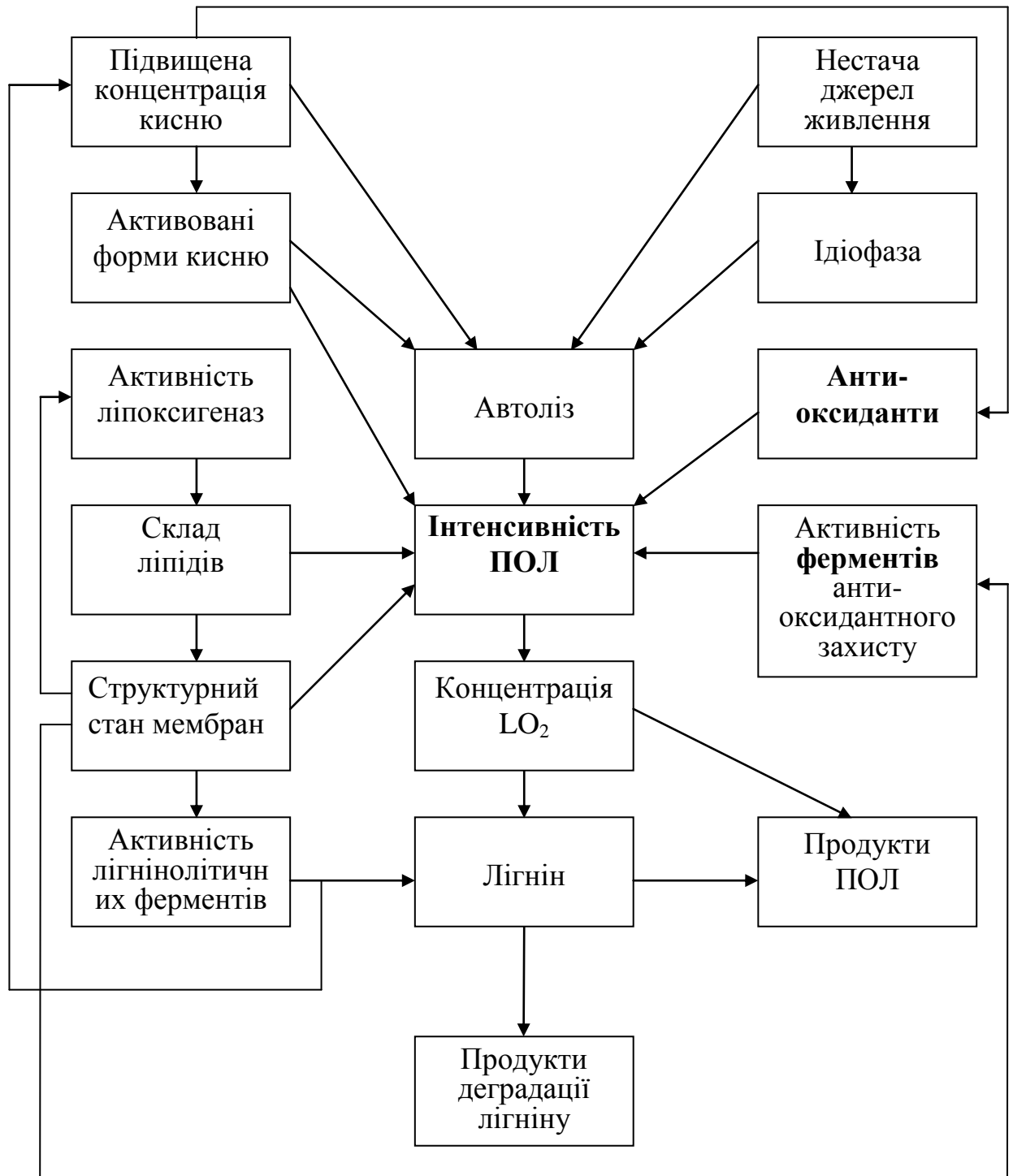


Рис. 1.4. Фактори, що впливають на активність перекисного окислення ліпідів у грибів (схема) [84]



Активному протіканню автолізу в міцелії лігнотрофів сприяє наявність у них високоактивних протеїназ.

Порушення компартменталізації клітинних структур, з одного боку, забезпечує контакт високоактивних ліпоксигеназ із легкоокислюваними високоненасиченими ліпідами мембран міцелію, з іншого боку – сприяє різкій зміні каталітичної активності багатьох ферментів, наприклад, пероксидази, лакази, каталази, ліпоксигенази.

У результаті порушується стаціонарність (сталість) процесів ПОЛ, що супроводжується утворенням високоактивних ліпідних радикалів, які, у свою чергу, беруть участь в атаці на лігнін деревини. Про активацію процесів ПОЛ свідчить утворення гідропероксидів ліпідів, ТБК-активних продуктів і 1-октен-3-ола, попередником якого є лінолева кислота.

Таким чином, вільно-радикальне окиснення лігніну, що ініціюється лігнінолітичними ферментами, може помітно посилюватися пероксидними радикалами ліпідів ( $\text{LO}_2$ ), що і забезпечує поєднання процесів ПОЛ із деструкцією лігніну.

Ця гіпотеза узгоджується з наслідками робіт ряду закордонних дослідників [190, 311, 334, 344].

Характер і ступінь розвитку ПОЛ у грибів різних екологічних груп значною мірою залежить від складу ліпідів і особливостей систем, що запускають і гальмують ці процеси [84].

Можна сподіватися, що пізнання закономірностей протікання процесів ПОЛ і їхньої регуляції у грибів дозволить розробити науково-обґрунтовані шляхи керування цими процесами й оптимізувати біотехнологічні засоби виробництва поліненасичених сполук ліпідної природи, істотно збільшивши тим самим їх вихід. Результати цих досліджень можуть стати також науковим фундаментом для практичної розробки нових екологічно чистих біотехнологій біодеструкції хімічно стійких полімерів, делігніфікації деревини або інших видів лігноцелюлозної сировини, наприклад, при виробництві паперу.

#### 1.4. Антиоксидантні оксидоредуктази

Під дією різноманітних факторів, в тому числі і несприятливих умов життєдіяльності, відбувається ушкодження клітин, в якому приймають участь активні форми кисню – супероксидний і гідроксильний радикали, синглетний кисень і перекис водню. Є різні системи адаптаційних перебудов і захисту живих клітин від їх дії. Дезактивація вільних радикалів може відбуватися як неензиматичним, так і ензиматичним шляхом [13, 32, 47]. В першу чергу це антиоксидантні ферменти: супероксиддисмутаза (СОД), каталази, пероксидази, глутатіонредуктаза та деякі низькомолекулярні сполуки [59, 68, 126, 127, 288].

В функціонуванні окисно-відновних процесів в живому організмі приймають участь численні ферменти, в тому числі каталаза і пероксидаза.

**Каталаза** ( $\text{H}_2\text{O}_2$ -оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6) є одним із надзвичайно функціонально лабільних ферментів. Треба відмітити, що серед антиоксидантних ферментів найбільше вивчені каталази рослинного, мікробного і тваринного походження [50, 59, 103, 111]. Біосинтез та властивості каталаз грибного походження, в т.ч. базидіомікотових, залишаються малодослідженими.

Фермент каталаза широко використовується для наукових досліджень, в медицині в якості діагностичного реагенту, харчовій, текстильній, шкіряній, електронній і хімічній галузях промисловості, де відчувається його стійкий дефіцит [50, 103].

В комерційних цілях каталазу отримують з печінки ссавців, а також використовують фермент грибного походження, продуцентом якого є *Aspergillus niger* [50].

Теоретична і практична значимість каталази обумовлює необхідність подальшого пошуку нових продуцентів ферменту і дослідження його властивостей.

Вивчення антиоксидантних ферментів штамів меланінвмісних грибів

дозволило встановити, що антиокисні системи можуть приймати участь в механізмі толерантності паразита як до протиінфекційних реакцій, так і до екстремальних дій середовища. Каталазна активність зареєстрована в усіх варіантах досліду. Автори припускають, що штучне пригнічення у грибів систем захисту від активних форм кисню може бути одним з напрямків боротьби з захворюваннями рослин [1, 17, 103].

Пошук нових продуцентів позаклітинної каталази серед грибів роду *Penicillium*, здійснений Р.В. Михайловою і співр. включав 115 штамів 47 видів цього роду. Отримані дані цього дослідження свідчать про те, що 39 штамів (33,91 %) не продукують позаклітинну каталазу, 76 штамів – представники різних видів роду *Penicillium* здатні продукувати екзоклітинну каталазу в умовах глибинного культивування. В якості об'єктів для подальшого вивчення біосинтезу позаклітинної каталази запропоновані штами видів *P. camamberti*, *P. canescens*, *P. funiculosum*, *P. janczewskii*, *P. glabrum* та *P. lilacinus* [103].

Крім пошуку продуцентів, вивчається і вплив умов культивування на біосинтез каталази. Так, за даними Ж.І. Павловської і співр., вивчення впливу компонентів живильного середовища на утворення екзоклітинної каталази *Penicillium piceum* F-648 показало, що максимальний синтез ферменту відбувається на середовищі, яке містить в якості джерела азоту  $\text{KNO}_3$  (0,8%) та джерела вуглецю – глюкозу (6%). Внесення в живильне середовище 2% екстракту солодових ростків активізувало синтез каталази в 3,9 рази, а сульфату заліза ( $10 \text{ мг/дм}^3$ ) – збільшувало продукуючу здатність міцелію гриба в 2,5 рази. Також встановлено, що наявність у середовищі 0,5% тритона Х-100 сприяла секреції ферменту [111, 112].

В продовження цих досліджень, вивчали вплив умов культивування *Penicillium piceum* F-648 на синтез каталази і глюкозооксидази. Встановлено, що оптимальною умовою для одночасного синтезу каталази і глюкозооксидази є глибинне культивування *P. piceum* F-648 на середовищі з вихідним рН 5,0-6,0 при температурі 25°C. В якості посівного матеріалу

необхідно використовувати спорову суспензію 2,5-3 місячної культури в кількості  $4,8-9,6 \times 10^5$  спор/см<sup>3</sup> живильного середовища [112].

Численні дослідження ферментативної активності видів базидієвих грибів проведені в відділі мікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України [65]. Однак, не вивчалася кореляція між ферментативною активністю, зокрема активністю оксидоредуктаз, та антиоксидантною активністю базидіальних грибів.

Як вже зазначалося, гриби використовуються в біотехнології як продуценти різноманітних речовин (органічні кислоти, вітаміни, пігменти, антибіотики, гербіциди тощо). Більшість з цих речовин відносяться до так званих вторинних метаболітів, синтез яких здійснюється культурою певного гриба в умовах гальмування росту на фоні розвитку окислювального стресу, що пов'язано з підвищенням рівня активних форм кисню (АФК) в клітині.

Здатність АФК окислювати білки, ліпіди, ДНК і інші органічні сполуки викликає активацію внутрішньоклітинних захисних механізмів. Стійкість тих чи інших організмів до дії факторів зовнішнього середовища, а також видова тривалість життя напрямую пов'язані з активністю антиоксидантного захисту (АОЗ) клітини.

Система АОЗ представлена як ферментами, так і низькомолекулярними сполуками. До останніх, зокрема, відносяться пігменти – каротиноїди та меланіни, які приймають участь в захисті організму від дії несприятливих факторів зовнішнього середовища, стабілізують мембрани, є попередниками полових гормонів та відіграють певну роль у процесах диференціації [30].

Цікаві у теоретичному і практичному плані дослідження активності каталази у каротиносинтезуючих грибів. За даними Н.Н. Гесслер і співробітників, каротиноїдсинтезуючий гриб *Neurospora crassa* під дією світла активує ферменти АОЗ та синтез каротиноїдів. При розвитку окислювального стресу в темноті *N. crassa* адекватно збільшує активність СОД і каталази при збільшенні синтезу каротиноїдів. Таким чином, у *N. crassa* нейроспораксантин діє як фотопротектор, тоді як у *Blakeslea trispora*

$\beta$ -каротин виконує функцію основного антиоксиданту при інактивації ферментів АОЗ [59, 60].

**Пероксидази** (КФ 1.11.1.7) каталізують окислювання різних поліфенолів, амінів, а також жирних кислот, цитохрому, глутатіону. Ферменти розкладають  $H_2O_2$  зі звільненням активного атомарного кисню, який йде на окислювання [7, 85]. З'ясовано, що пероксидази разом з каталазою відіграють певну захисну роль антиоксидантної системи організму на несприятливі умови життєдіяльності і інфекції при утворенні токсичних сполук реакцій перекисного окиснення ліпідів [85, 91, 93].

Інтерес до пошуку грибів – продуцентів ферменту пероксидази пояснюється декількома причинами. Виявлені широкі можливості використання його в якості діагностичного реагенту чи маркерного ферменту в імуноферментному аналізі, як консерванту в харчовій промисловості, речовини, що сприяє прискоренню дозрівання коньяків і поліпшує їх якість, для детоксикації промислових відходів, в т.ч. фенолвмісних стічних вод, відбілювання целюлозної пульпи тощо [5, 7, 46, 68, 109].

Дефіцит цього ферменту відчувається все гостріше, і рослинна пероксидаза, яку отримують з коренів хрону *Armoracia rusticana* Gaertn. Mey. не може задовольнити всі потреби. У зв'язку з цим виник інтерес до пошуку нових джерел пероксидази та вивчення властивостей ферменту мікробіологічного (в т.ч. грибного) походження.

Так, цей фермент виявлено у базидієвих дереворуйнівних грибів, гіфоміцетів, бактерій роду *Rhizobium* [29, 126, 127]. Однак, грибів, що мають здатність до підвищеного синтезу пероксидази, виявлено небагато: *Pyricularia filamentosa*, *Caldariomyces fumago*, *Myrothecium verrucaria*, *Mucor hiemalis*, *Coprinus macrorhizus*, *Coprinus cinereus*, *Arthromyces ramosus*, *Inonotus weirii*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Cerrena maxima* [126].

В роботі І.А. Решетнікової і співробітників, спрямованої на пошук грибів – продуцентів пероксидази, вивчено більш як 150 штамів грибів порядків *Hyphomycetales* (18 родів), *Sphaeropsidales* (4 роду), *Aphylllophorales*

(21 рід), *Agaricales* (13 родів) [126].

Найвища пероксидазна активність відмічена для дереворуйнівних базидієвих грибів, зокрема, в культуральній рідині грибів *Phellinus igniarius* та *Ph. tremulae*. В результаті проведених досліджень з культуральної рідини гриба *Phellinus igniarius* виділена пероксидаза, гомогенність якої підтверджена електрофорезом. Вихід пероксидази з 1 л культуральної рідини становив 3-3,5 мг, питома активність 130-150 мкмоль/ хв. на 1 мг білку. Отримана грибна пероксидаза з *Ph. igniarius* стійка в кислих середовищах, перспективна для використання в імуноферментному аналізі, а також в інших галузях біохімії і медицини [126].

Цікаві дані щодо зміни пероксидазної активності клітин організмів за дії різноманітних чинників. Відомо, що спостерігається достовірне збільшення пероксидазної активності клітин картоплі при патогенезі *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) [61] та в паростках сосни звичайної, уражених *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. [91], озимих зернових під час водного дефіциту та за дії температурного стресу [85, 93] тощо. Літературні дані стосуються рослинних організмів. Дані щодо зміни пероксидазної активності грибів за дії біотичних чи абіотичних факторів поодинокі [96, 106].

Про актуальність вивчення ферментів базидіальних ксилотрофів йдеться у роботах О.В. Корольової [87, 88]. Зазначається, що в теперішній час велике значення приділяється проблемі біоконверсії і, в тому числі, біодеградації одного із самих стійких до хімічного і мікробіологічного розкладання біополімеру – лігніну. Базидієві гриби – збудники білої гнилизни деревини, є єдиними організмами, які здатні до руйнації лігніну. Вони синтезують мультиферментний комплекс лігнінолітичної дії, що приймає участь у процесі деградації лігніну. Неспецифічність ферментів лігнінолітичної дії та їх висока окислювальна здатність відкривають широкі можливості для використання як самих грибів, так і їх лігнінолітичних

ферментів в системах детоксифікації та деградації ксенобіотиків, біоремедіації ґрунтів та води.

Таким чином, розробка екологічно чистих біотехнологій як для обробки і модифікації лігнінвмісних матеріалів, так і для утилізації лігнінвмісних відходів (особливо для целюлозно-паперової і текстильної галузей промисловості), інтенсифікувала вивчення механізму деградації лігніну базидієвими грибами і ролі їх лігнінолітичних ферментів в цьому процесі. Результати цих досліджень дадуть можливість оцінити вклад різноманітних ферментів в процес делігніфікації і встановити кореляцію між ефективністю деградації лігніну, біосинтезом лігнінолітичних ферментів і особливостями механізму їх дії. Через те, є потреба розширення пошуку продуцентів антиоксидантних оксидоредуктаз серед базидієвих грибів та встановлення кореляції між їх ферментативною і антиоксидантною активністю.

### **1.5. Антиоксидантні властивості пігментів – каротиноїдів та меланінів**

Серед речовин, які мають антиоксидантні властивості, визнане місце посідають низькомолекулярні сполуки – каротиноїди і меланіни.

**Каротиноїди** – природні органічні пігменти, що синтезуються бактеріями, грибами, водоростями і рослинами. Зараз ідентифіковано близько 600 видів каротиноїдів, які поділяють на два класи: ксантофіли та каротини. Вони мають переважно жовтий, помаранчевий або червоний колір, за своєю будовою це циклічні або ациклічні ізопреноїди [27, 30]. Ізопреноїди – терпеноїди, природні сполуки з групи ліпідів, які утворюються в живих організмах з мевалонової кислоти. Формально всі ізопреноїди – полімери вуглеводню ізопрену, котрий, однак, не бере участь у метаболізмі ізопреноїдів. Побудова вуглецевого скелета ізопреноїдів відбувається в живих клітинах шляхом послідовної ферментативної конденсації з

мевалонової кислоти. Величезна структурна різноманітність ізопреноїдів обумовлена здатністю первинних продуктів конденсації до реакцій циклізації, окиснення, відновлення, перегрупування, а також до включення або елімінування одного або декількох одновуглецевих фрагментів і до приєднання до інших метаболітів клітини (так звані змішані ізопреноїди). За структурною ознакою ізопреноїди поділяються на підкласи терпенів (монотерпени), сесквітерпенів тощо. Серед ізопреноїдів безліч фізіологічно активних речовин: антибіотики, вітаміни А, D, Е, К, гамони і гормони, жовчні кислоти і спирти, кардіотонічні речовини, феромони, пігменти, у т.ч. такі, що беруть участь у фотосинтезі [30].

Каротиноїди легко утворюють перекиси, в яких молекула кисню приєднується за місцем подвійного зв'язку і потім може брати участь в окисненні різних сполук.

Їх антиоксидантна функція, зокрема в хлоропластах, зараз добре відома, особливо як інактиваторів синглетного кисню та вільних радикалів. У хлоропластах синглетний кисень частіше за все утворюється внаслідок взаємодії кисню зі збудженими молекулами хлорофілу, що перебувають у порівняно довго живучому триплетному стані. Це відбувається, наприклад, при дії надінтенсивного світла, коли не вся енергія поглинутого сонячного світла встигає використовуватись для фотосинтезу. Для того, щоб зменшити таку небезпеку, в хлоропластах як раз і присутні специфічні пігменти – каротиноїди, де вони виконують подвійну роль. З одного боку, вони є допоміжними пігментами світлозбиральної антени, що уловлюють сонячне світло певного спектрального складу. З іншого – каротиноїди виконують захисні функції: вони приймають на себе енергію від надлишкової кількості збуджених молекул хлорофілу та безпечним для фотосинтетичного апарату шляхом розсіюють у вигляді теплової енергії [59, 105].

Вивчення дії високоактивних кисневих радикалів як регуляторів біосинтезу каротиноїдів хромопластів показало, що вони індукують експресію множинного каротиногенного гена, внаслідок чого утворюються



значні кількості капсантину. Сигнали активних форм кисню (АФК) від пластид та мітохондрій також суттєво впливають на цей процес. Н.Ю. Таран, О.А. Оканенко, Л.М. Бацманова, М.М. Мусієнко вважають АФК новим класом вторинних месенджерів, що ініціюють синтез каротиноїдів [105].

Роль каротиноїдів в безхлорофільних грибних організмах та бактеріях ще менш досліджена.

У ряді робіт показано, що одними з важливих антиоксидантних засобів захисту у грибів є каротиноїдні пігменти [59, 60, 63, 81, 100]. Встановлено, що близько третини представників грибного царства здатні до синтезу каротиноїдів, в основному, під дією світла. Каротиноїди у грибів приймають участь в захисті організму від дії несприятливих факторів зовнішнього середовища, стабілізують мембрани, є попередниками полових гормонів. Вони відіграють певну роль у процесах диференціації та у реакціях фототропізму і фототаксису [59, 60].

Класичними модельними об'єктами для дослідження каротиногенезу давно стали гриби *Neurospora crassa* та *Blakeslea trispora*.

На тепер встановлено, що ферменти гриба *N. crassa*, які каталізують як утворення, так і денатурацію фітину, скоріше за все є фотоіндукуємими. У цього гриба кількісний і якісний склад каротиноїдів також змінюється під впливом умов культивування: природи джерел живлення – вуглецю і азоту, їх співвідношення у живильному середовищі, мінеральних солей, вітамінів, аерації, рН та температури.

Цікавий приклад хімічного контролю каротиногенезу спостерігається у *B. trispora*. При роздільному вирощуванні (+)- і (-)- штами синтезують каротиноїди в незначних кількостях, тоді як в змішаних культурах відбувається інтенсивний синтез каротину. Цей синтез індукується триспоровою кислотою – гормоном, який утворюється під дією комбінації ферментів з двох штамів змішаної культури. Триспорова кислота є проміжним продуктом біосинтезу каротину, і її головна функція полягає в стимуляції споруляції і репродукції. Не виключено, що стимуляція

каротиногенезу є частиною механізму, що забезпечує посилення синтезу триспорової кислоти [59, 60]. У недавніх роботах показано, що в умовах поверхневого культивування при статевій взаємодії гетероталічних штамів *B. trispora*, що здатні до інтенсивного утворення зигоспор, спостерігалось зниження рівня каротиногенезу в порівнянні зі штамми, що росли окремо. Навпроти, при статевій взаємодії штамів, не спроможних до зиготоутворення, відбувалася стимуляція каротиногенезу. У глибинній культурі пари штамів, що є зиготоутворюючими, синтезували значно більше триспорових кислот, але менше каротиноїдів, ніж штами, що не утворюють зигоспор. Виявлена обернена залежність між зиготоутворенням і каротиногенезом, що дозволило запропонувати в якості критерію для добору каротиногенних пар штамів їхню нездатність до зиготоутворення [59, 60].

**Меланіни** – високомолекулярні пігменти, які синтезуються рослинами, грибами і мікроорганізмами та представляють собою полімери фенольної і (або) індольної природи, хоча до теперішнього часу не існує єдиної думки щодо тлумачення самого терміну меланіни [30, 44, 78]. Дослідження природи меланінів і особливо їх метаболізму показали поліфункціональність цих сполук. Загальновизнано, що меланіни відіграють роль універсальних протекторів у живих організмів при дії факторів мутагенної і канцерогенної природи на клітинному рівні, що поставило їх в ряд перспективних компонентів при створенні нових поколінь лікарських засобів [262].

Розрізняють два шляхи синтезу меланінів, які приводять до принципової різниці в їх будові і властивостях. Меланіни розділяють на два класи: еумеланіни (нерозчинні) та феомеланіни (розчинні в лугах) – найбільш близькі сполуки до гумінових речовин [30].

Дослідженням природи меланінових пігментів грибів активно займалася група вчених під керівництвом Н.М. Жданової. На підставі досліджень кольорових мутантів *Cladosporium cladosporioides*, *Stemphylium botryosum*, *S. ilicis* і *S. sarciniforme* були отримані й ідентифіковані попередники меланінового пігменту та встановлено, що світло стимулює

кількісне накопичення основних попередників пігменту пентакетидної природи: сциталона, флавіолина, біофлавіолина і 2-оксиюглона [78].

На теперішній час шляхи синтезу меланіну деякими міксоміцетами в певній мірі вивчені, в той час, як вміст і структура меланінів базидієвих грибів залишаються мало з'ясованими, до тепер не відомі і інгібітори чи індуктори меланіногенезу у цих грибів.

За даними літератури, базидієві гриби синтезують меланін із глютамінілгідроксibenzena, використовуючи при цьому тирозин або діоксифенілаланін. Поряд з цим, ароматичні сполуки можуть утворюватися і при циклізації різних цукрів. Такі перетворення протікають за схемою: глюкоза → дифорфорний ефір седогептульози → шикимова кислота → пара-оксибензойна кислота, з подальшим утворенням різноманітних хінонів і меланіну [78, 213].

Порівняльні дослідження грибного меланіну із *Aspergillus niger* і препарати гуміноподібних речовин, синтезованих базидієвим грибом *Coprinus maxima*, виявилися близькими за фізико-хімічними властивостями (елементний склад, поведження в кислотах і лугах) і ауксиноподібною активністю. Однак, на структурному рівні ці біополімери значно відрізняються один від одного. За даними ІК-спектроскопії отримані гуміноподібні речовини *C. maxima* мають більшу подібність до природних гумінових кислот та більш різноманітні за функціональними групами у порівнянні з меланінами *A. niger*. Автори дослідження припускають, що це пов'язано з участю в утворенні гуміноподібних речовин лакази, яка включається не тільки в синтез цих полімерів, але і їхню модифікацію і деградацію [1].

Грунтовні дослідження меланінових комплексів лікарських базидієвих грибів *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pil. та *Phellinus robustus* (P. Karst.) Bourd. et Galz. проведені групою науковців під керівництвом В.Г. Бабіцької та Н.А. Бісько [9, 197, 213].

Оскільки система антиоксидантного захисту представлена як

ферментами, так і низькомолекулярними сполуками, доцільно вивчити залежність між активністю оксидоредуктаз, вмістом поліфенолів, каротиноїдів і меланінів та антиоксидантною активністю базидієвих грибів.

### **Висновки до розділу 1**

Для наукового обґрунтування регулювання і використання прооксидантно-антиоксидантної активності нових видів і штамів базидієвих грибів, необхідно приділити увагу, в першу чергу, таким питанням, як:

1. Виділення та створення колекцій чистих культур базидієвих грибів.
2. Вивчення їх культурально-морфологічних та біохімічних характеристик: встановлення закономірностей росту і антиоксидантної активності, рівня перекисного окислювання ліпідів, каталазної і пероксидазної активності, вмісту поліфенолів і інших прооксидантних і антиоксидантних сполук;
3. Вивчення впливу факторів культивування на синтез антиоксидантних речовин і інтенсивність процесів ПОЛ з метою оптимізації умов ферментації.
4. Розробка методів одержання ферментних препаратів каталаз і пероксидаз грибного походження та вивчення їх фізико-біохімічних властивостей.
5. Визначення вмісту грибних пігментів – каротиноїдів і меланіну.
6. Розробка способів використання прооксидантно-антиоксидантних показників базидієвих грибів у біотехнології та екології.

## РОЗДІЛ 2.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Об'єкти і матеріал досліджень

Об'єктами дослідження були 58 штамів, що належать до 13 видів відділу *Basidiomycota*, порядків *Polyporales* та *Agaricales* (табл. 2.1.) [161]. Систематичне положення досліджуваних видів встановлено згідно сучасних літературних джерел [287].

Таблиця 2.1

#### Список досліджених видів та штамів базидієвих грибів

Вид	Номер штаму	Джерело надходження і місце збору вихідного матеріалу *
Біологічна класифікація		
1	2	3
Царство <i>Fungi</i>		
Відділ <i>Basidiomycota</i>		
Клас <i>Agaricomycetes</i>		
Порядок <i>Polyporales</i>		
Родина <i>Fomitopsidaceae</i>		
<i>Daedalea quercina</i> Fr.	Dq-08	КЛ
Родина <i>Ganodermataceae</i>		
<i>Ganoderma lucidum</i> (Curt.: Fr.) P. Karst.	G1-2	Сн
Родина <i>Phanerochaetaceae</i>		
<i>Irpex lacteus</i> Fr.	П-4k	Дн

1	2	3
Родина <i>Polyporaceae</i>		
<i>Fomes fomentarius</i> (L. ex Fr.) Gill.	T-10	Дн
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill.	Ls-08	Дн
Порядок <i>Agaricales</i>		
Родина <i>Strophariaceae</i>		
<i>Agrocybe cylindracea</i> (DC.) Gillet.	167	ІВК
	218	ІВК
	960	ІВК
Родина <i>Fistulinaceae</i>		
<i>Fistulina hepatica</i> Schff. ex Fr.	Fh-08	КЛ
Родина <i>Marasmiaceae</i>		
<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	523	ІВК
<i>Flammulina velutipes</i> (Curt.: Fr.) Sing.	F-03	ДБС
	F-06	ДБС
	F-073	ДБС
	F-1	Дн
	F-10	Дн
	F-102	НПП «СГ»
	F-104	НПП «СГ»
	F-107	НПП «СГ»
	F-112	НПП «СГ»
	F-2	Дн
	F-202	Дн
	F-204	Дн
	F-610	КЛ
	F-vv	Дн

1	2	3
Родина <i>Pleurotaceae</i>		
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> Singer.	P-citr	УкрМ
<i>Pleurotus eryngii</i> (DC.: Fr.) Quél.	P-er	УкрМ
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.: Fr.) P. Kumm.	D-140	Дн
	Нк-35	УкрМ
	P-004	Дн
	P-01	Дн
	P-035	Дн
	P-039	Дн
	P-081	ДБС
	P-082	ДБС
	P-083	ДБС
	P-087	ДБС
	P-088	ДБС
	P-089	ДБС
	P-105	СЛ
	P-107	СЛ
	P-12к	НПП «СГ»
	P-191	КЛ
	P-192	КЛ
	P-203	Дн
	P-206	Дн
	P-208	Дн
	P-209	Дн
	P-210	Дн
	P-2175	Дн
	P-447	Дн

1	2	3
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.: Fr.) P. Kumm.	P-6v	Дн
	P-кл	Дн
	P-14	НПП «СГ»
	P-4k	Дн
	P-91	Дн
	P-94	Дн
	P-998	Дн
Родина <i>Schizophyllaceae</i>		
<i>Schizophyllum commune</i> Fr.: Fr.	Sc-10	Дн

Примітки:

1. «\*» – скорочені назви джерел надходження і місце збору вихідного матеріалу
2. ДБС – Донецький ботанічний сад НАН України, м. Донецьк
3. Дн – м. Донецьк
4. КЛ – Краснолиманське (Лиманське) лісництво, Донецька обл.
5. НПП «СГ» – національний природний парк “Святі гори”
6. СЛ – Слов’янське лісництво, Донецька обл.
7. Сн – м. Сніжне, Донецька обл.
8. УкрМ – ТОВ «УкрМіцелій», м. Донецьк.

Кількість штамів, використаних на окремих етапах дослідження, обумовлена конкретною метою і вказана у відповідних розділах.

Всі штами підтримуються при  $+5\pm 1^{\circ}\text{C}$  на агаризованому пивному суслі (СА, 4° за Баллінгом) і пересіваються з перевіркою чистоти кожні 5-6 місяців [161]. Також вони передані до Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК) [215], що має статус Національного надбання України (Додаток В).

Матеріалами досліджень були міцелій та культуральний фільтрат (КФ),



які готували наступним чином. Після визначеного терміну культивування штаму, міцелій при  $5\pm 1^{\circ}\text{C}$  відділяли від культуральної рідини шляхом фільтрування. Одержували культуральний фільтрат та міцелій. Далі, міцелій промивали дистильованою водою, підсушували на фільтрувальному папері, гомогенізували шляхом розтирання в охолодженій до  $1\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  ступці. Гомогенат міцелію (МГ) зараз же використовували для приготування водної витяжки та визначення в ній і КФ показників прооксидантно-антиоксидантної системи, активності оксидоредуктаз та вмісту пігментів.

## **2.2. Методи інтродукції вищих базидієвих грибів у чисту культуру та перевірки їх генетичної неоднорідності**

Чисті культури базидіомікотових виділяли із плодових тіл або базидіоспор, спираючись на методи, що використовуються у експериментальній мікології [22, 73].

У разі появи контамінантів, колонії базидієвих грибів послідовно пересівали з обов'язковим наступним мікроскопічним контролем. Від сторонньої флори позбавлялися за допомогою методів мікробіологічної техніки. Для пригнічення росту бактерій, які забруднюють грибні культури, при виділенні використовували підкислений агар (рН 4,5-5,0) або у сусло-агар (СА) вносили антибіотики [34, 73].

Чисті міцеліальні культури, ізоляти і штами підтримували (зберігали) шляхом пересівів через 5-6 місяців на агаризоване незахмілене пивне сусло (СА, 4° за Баллінгом) і інші агаризовані живильні середовища, зберігаючи їх у холодильнику при  $+5\pm 1^{\circ}\text{C}$  [161].

Для виявлення оксидазної активності і типу гнилизни штамів дереворуйнівних базидієвих грибів – метод Бавендамма [73]; а для встановлення генетичної неоднорідності – тести на вегетативну сумісність штамів одного виду [76], попарно культивуючи міцелії на стерилізованому середовищі СА чи картопляно-глюкозний агар (КГА) в чашках Петрі при

$25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Фіксували утворення та тип баражу на лінії контакту міцеліїв: W (*weak*) – слабка реакція вегетативної несумісності, N (*normal*) – помірна реакція, S (*strong*) – сильна реакція. Відсутність баражу – C (*compatibility*) – свідчить про генетичну однорідність досліджуваних штамів. Для подальших досліджень відбирали тільки генетично неоднорідні штами одного виду.

## **2.3. Умови культивування та методи дослідження росту вегетативного міцелію штамів базидієвих грибів**

### **2.3.1. Склад живильних середовищ**

Вивчення швидкості росту вегетативного міцелію, культуральної-морфологічних особливостей дослідних штамів базидіомікотових проводили на натуральному – агаризоване пивне сусло (СА) та комплексному – картопляно-глюкозний агар (КГА) живильних середовищах (табл. 2.2).

Всі середовища готували та стерилізували за загальноприйнятими методиками [34, 73].

Для вивчення біосинтетичних характеристик культур, вегетативний міцелій вирощували періодично поверхнево на глюкозо-пептонному середовищі (ГПС) наступного складу (г/ дм<sup>3</sup>) [22]:

глюкоза – 10,0; пептон – 3,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,6;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,4;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{CaCl}_2$  – 0,05;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,001, дистильована вода – до 1 дм<sup>3</sup>;

в колбах Ерленмейєра об'ємом 250 см<sup>3</sup>, що містили 50 см<sup>3</sup> живильного середовища. Вихідне значення рН середовища (після стерилізації у автоклаві) та температура культивування були індивідуальними і оптимальними для кожного штаму в залежності від значень, що були встановлені на попередньому етапі досліджень в інтервалі температур від  $+17,5$  до  $+32,5^{\circ}\text{C}$  та рН – від 3,0 до 8,0. Враховували також відомості, що для більшості штамів базидієвих грибів температурний оптимум росту знаходиться при  $25-28^{\circ}\text{C}$ , а рН – 5,5-6,0 [22, 73].

Склад агаризованих живильних середовищ

Середовище	Компонент	Кількість	pH
Агаризоване пивне сусло 4° за Баллінгом (СА)	Пивне сусло 16° за Баллінгом	250 см <sup>3</sup>	6,5±0,3
	Агар-агар мікробіологічний	10 г	
	H <sub>2</sub> O (дистильована)	до 1 дм <sup>3</sup>	
Картопляно-глюкозний агар (КГА)	Картопля (чищена, подрібнена, 30-ти хв. відвар)	200 г	6,5±0,3
	Глюкоза	20 г	
	Агар-агар мікробіологічний	10 г	
	H <sub>2</sub> O (дистильована)	до 1 дм <sup>3</sup>	

Оптимізацію співвідношення компонентів вихідного глюкозо-пептонного середовища, згідно поставлених завдань нашого дослідження – розробити живильні середовища для культивування штамів-продуцентів антиоксидантних речовин, проводили, використовуючи математичне планування за методом повного факторного експерименту – ПФЕ-2<sup>4</sup> шляхом зміни кількісного співвідношення його компонентів [2, 97].

Для отримання плодових тіл з заданою метою експерименту чи підтвердження систематичного положення окремих видів базидіомікотових, використовували лігноцелюлозний субстрат на основі свіжого лушпиння соняшника, не зараженого сторонньою мікрофлорою, вологістю 65-70% [34].

### 2.3.2. Визначення ростових характеристик штамів

Ріст грибів – це процес, що полягає в прирості біомаси, тобто в збільшенні розмірів або кількості клітин в результаті складних змін загального і видоспецифічного обміну речовин. Суттєвий вплив на характер росту і на спрямованість метаболізму культури гриба мають способи її культивування, які забезпечують постачання киснем, неоднакову швидкість дифузії живильного середовища, відтік інгібіторів – продуктів метаболізму тощо [73, 122].

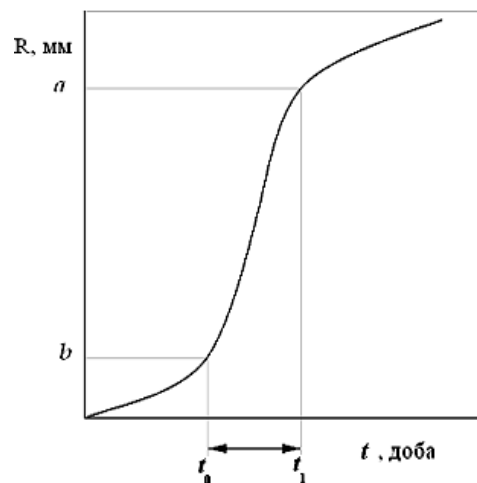


Рис. 2.1. Залежність радіусу (R) колонії від часу (t)

Для визначення ростових характеристик, культури різних видів вирощували на агаризованих середовищах СА і КГА. Штами, що досліджувались, висівали в чашки Петрі в центр поверхні щільного живильного середовища блоком діаметром 5 мм, завжди однієї щільності і віку. Діаметр або радіус колоній вимірювали в двох взаємно протилежних напрямках через визначені проміжки часу. Кількість вимірів залежала від швидкості росту гриба.

З метою оцінки росту культур вищих базидіомікотових використовували наступний метод (рис. 2.1.). На підставі дослідження та аналізу динаміки збільшення радіусу ( $R$ , мм) колоній від часу культивування ( $t$ , доба), швидкість радіального росту вегетативного міцелію ( $Vr$ , мм/добу) кількісно визначали у фазі лінійної залежності приросту радіусу колонії від часу культивування за формулою, запропонованою Е.Ф. Соломко та співр. [133]:

$$Vr = \frac{a - b}{t_1 - t_0}, \quad (2.1)$$

де:  $a$  – радіус колонії наприкінці росту, мм;  $b$  – радіус колонії на початку фази лінійного росту, мм;  $t_I - t_0$  – тривалість лінійного росту, діб (рис. 2.1.).

Штами також культивували на рідких живильних середовищах

в умовах періодичної культури.

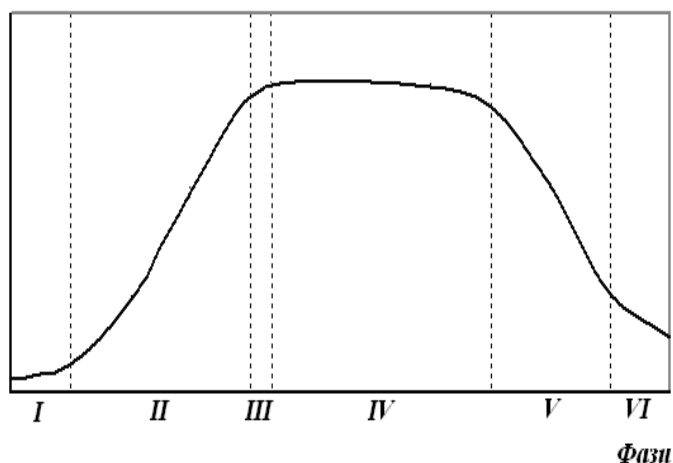
Ріст популяції клітин в умовах періодичної культури має вигляд

графічної кривої (рис. 2.2.), що

описує залежність логарифму кількості живих клітин від тривалості культивування [121, 122]. Фази росту періодичної культури: *I* – лаг-фаза; *II* – експоненційна; *III* – сповільненого росту; *IV* – стаціонарна; *V* – відмирання; *VI* – виживання.

Накопичення міцеліальної біомаси ( $Bm$ ) при культивуванні на рідких живильних середовищах, визначали ваговим методом. Для цього вирощений міцелій промивали, і за допомогою фільтрувального паперу видаляли надлишки рідини. Підготовлений у такий спосіб міцелій зважували у відкаліброваних бюксах і висушували при  $+104 \pm 2^\circ\text{C}$  до постійної маси для розрахунку його вологості і абсолютно сухої біомаси (АСБ) [50, 73, 174].

Оцінювання процесу ферментації здійснювали за показниками: концентрація біомаси ( $X$ ) та перерахунку її на АСБ, продуктивність за біомасою ( $Q_x$ ), продуктивність за продуктом ( $Q_p$ ), вихід продукту від субстрату ( $Y_p/s$ ) [121, 122].



Тривалість культивування

Рис. 2.2. Крива росту популяції клітин в умовах періодичної культури.

## 2.4. Біохімічні методи дослідження

### 2.4.1. Визначення кислотності розчинів

Кислотність живильних середовищ, культуральної рідини та робочих розчинів визначали потенціометричним методом з використанням рН-метрів марок «рН-340» та «рН-150 МИ» [73].

### 2.4.2. Визначення вмісту цукрів

В живильних середовищах та культуральній рідині визначали вміст цукрів мікрометодом А.С. Швецова і Є.Х. Лукьяненко, який ґрунтується на відновленні ферицианіду калію редукуючими цукрами в лужному середовищі до ферицианіду, який у присутності желатину утворює з сірчаноокислим окисним залізом стійке сине забарвлення розчину. Цей метод є модифікацією метода Н.І. Ястрембовича і Ф.Л. Калініна та більш придатний для масових аналізів і дозволяє визначати концентрацію цукрів в розчинах від 0,01 до 0,1 мг в 1 см<sup>3</sup> [101].

Вміст цукрів в дослідних розчинах встановлювали за допомогою каліброваних пробірок, які мали розчини глюкози з концентраціями від 0,01 до 0,1 мг/см<sup>3</sup> (вихідна концентрація розчину глюкози – 0,1 мг/см<sup>3</sup>) та розраховували за формулою [101]:

$$C_{\partial} = f \cdot D_{\partial} \cdot 100 \text{ (мг/см}^3\text{)}, \quad (2.2)$$

де:  $C_{\partial}$  – вміст цукрів в дослідних розчинах;  $f = \Sigma C / \Sigma D$  – коефіцієнт пропорційності;  $C$  – концентрація розчину глюкози, мг/см<sup>3</sup>;  $D$  – оптична густина розчину глюкози;  $D_{\partial}$  – оптична густина дослідного розчину; 100 – розведення дослідного розчину.

### 2.4.3. Визначення ефективності знебарвлення

Ефективність знебарвлення ( $E_{\text{зн}}$ ) анілінового барвнику розраховували за формулою [291]:

$$E_{\text{зн.}} = \frac{C_0 - C_i}{C_0} \cdot 100\%, \quad (2.3)$$

де:  $C_0$  – концентрація барвнику до деструкції,  $C_i$  – концентрація барвнику після деструкції.

Визначення концентрації барвнику проводили наступним чином. Готували стандартні розчини барвнику з концентраціями від 0,01 до 1,0 г/дм<sup>3</sup>, вимірювали їх оптичну щільність за допомогою фотоелектроколориметру при 595-625 нм. Концентрацію барвнику визначали за калібрувальним графіком з урахуванням оптичної щільності живильного середовища.

## 2.5. Методи дослідження біосинтетичної активності базидієвих грибів

### 2.5.1. Визначення показників процесів перекисного окиснення ліпідів

Для оцінки процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) широко використовують тест з тіобарбітуровою кислотою – ТБК-тест у різних модифікаціях, які були розроблені для визначення вмісту продуктів ПОЛ в матеріалі. Метод заснований на визначенні кількості забарвленого продукту, який утворюється в результаті взаємодії двох молекул ТБК з однією молекулою маленового діальдегіду (МДА) – одного із вторинних продуктів ПОЛ. Встановлено, що реакцію з ТБК дає не тільки МДА, а й багато інших карбонільних сполук, які утворюються під час ПОЛ. Тому разом їх називають ТБК-активні продукти (ТБК-АП) [82, 84].

Для встановлення рівня самочинної інтенсивності процесів ПОЛ, до 1,5

см<sup>3</sup> водної витяжки міцелію або 0,5 см<sup>3</sup> КФ (контроль – дистильована вода) додавали розчини трихлороцтової кислоти (ТХО) та тіобарбітурової кислоти (ТБК) до кінцевих концентрацій в реакційній суміші 0,61 та 0,37 моль/дм<sup>3</sup>, відповідно. Суміш кип'ятили 15 хв. на водяній бані та швидко охолоджували до +20°C; центрифугували 15 хв. при 1700 g. З метою визначення рівня індукованої інтенсивності процесів ПОЛ, до вказаних об'ємів водної витяжки міцелію або КФ (контроль – дистильована вода) додавали 1·10<sup>-3</sup> моль/дм<sup>3</sup> розчин сірчаноокислого заліза і 1·10<sup>-2</sup> моль/дм<sup>3</sup> аскорбінової кислоти. Інкубацію суміші при 40°C проводили протягом 90 хв. Екстинкцію супернатанту дослідної проби вимірювали проти контрольної на спектрофотометрі при 532 нм і 590 нм. Розрахунок самочинної ( $A_c$ ) та індукованої ( $A_i$ ) інтенсивності ПОЛ міцелію або КФ здійснювали за формулою [135, 168]:

$$A_c(A_i) = \frac{(E_{532} - E_{590}) \cdot 10^6 \cdot V \cdot K}{1,56 \cdot 10^5 \cdot P} \quad (2.4)$$

де:  $E_{532}$  і  $E_{590}$  – показники екстинкції; 10<sup>6</sup> – фактор розмірностей;  $V$  – об'єм реакційної суміші (см<sup>3</sup>);  $K$  – коефіцієнт перерахунку на АСБ міцелію; 1,56 · 10<sup>5</sup> – молярний коефіцієнт екстинкції;  $P$  – наважка сирого міцелію (г) або об'єм КФ (см<sup>3</sup>). Кількість продуктів ПОЛ, активних до ТБК (ТБК-АП) виражали в нмоль/г АСБ або нмоль/см<sup>3</sup> КФ.

За отриманими даними розраховували показник прооксидантної активності ( $ПОА$ ),

$$ПОА = \frac{A_c}{A_i} \quad (2.5)$$

який характеризує активність прооксидантної складової прооксидантно-антиоксидантної системи та показник резерву субстратів перекисного окислення ( $СПО$ ),

$$СПО = \frac{A_i - A_c}{A_i} \cdot 100\% \quad (2.6)$$



який вказує на можливість індукції ПОЛ за умов дії факторів середовища [168, 175].

### 2.5.2. Визначення антиоксидантної активності

Загальну антиоксидантну активність (АОА) мікологічного матеріалу оцінювали за інтенсивністю гальмування накопичення продуктів ПОЛ в модельній реакції окиснення Твін-80 киснем повітря. При цьому до мікологічного матеріалу (контроль – дистильована вода) додавали  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup> розчин сірчанокислого заліза,  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/дм<sup>3</sup> аскорбінової кислоти та 1% водний розчин Твін-80. Інкубацію проводили в герметичних ємностях об'ємом 100 см<sup>3</sup> при 40°C протягом 24 годин. Потім в реакційній суміші визначали вміст продуктів ПОЛ, активних до тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП). АОА розраховували за формулою [168, 175]:

$$AOA = \frac{A_{\kappa} - A_{\partial}}{A_{\kappa}} \quad (2.7)$$

де  $A_{\kappa}$ ,  $A_{\partial}$  – вміст ТБК-АП в контрольному і дослідному зразках відповідно.

### 2.5.3. Розрахунок коефіцієнту рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи

Показники антиоксидантної активності та прооксидантної активності використовували для розрахунку коефіцієнту рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи ( $K_{PAC}$ ) мікологічного матеріалу за формулою [168, 175]:

$$K_{PAC} = \frac{AOA}{ПОА} \quad (2.8)$$

#### 2.5.4. Визначення загального вмісту поліфенолів

Визначення загального вмісту поліфенолів (ПФ) проводили у спиртових витяжках за модифікованою методикою Фоліна-Чокальтеу [6]. Масову частку поліфенолів (W) обчислювали за формулою [157]:

$$W = (D - D_{\text{inter}}) \cdot V_s / (S_{\text{std}} \cdot m_s \cdot w_{\text{dm, s}}), \quad (2.9)$$

де:  $m_s$  – маса проби;  $D$  – оптична густина розчину;  $D_{\text{inter}}$  – точка перетину калібрувальної прямої з віссю Y;  $S_{\text{std}}$  – коефіцієнт нахилу калібрувальної прямої;  $V_s$  – об'єм екстракту (10 см<sup>3</sup>);  $w_{\text{dm, s}}$  – вміст сухої речовини в пробі.

#### 2.5.5. Визначення загального вмісту каротиноїдів

Для визначення загального вмісту каротиноїдів, міцелій гомогенізували шляхом розтирання у стерильній ступці та екстрагували ацетоном у співвідношенні 1:10. Суміш центрифугували протягом 10 хвилин при 2000 g. Визначення кількості каротиноїдів проводили в міцелії – на одиницю маси, г та КФ – на одиницю об'єму, см<sup>3</sup> спектрофотометричним методом та розраховували за формулою Ветштейна [105].

$$C_{\text{к+кк}} = 4,695 \times D_{440-0,268} \quad (2.10)$$

Потім вираховували вміст пігменту в дослідному матеріалі в перерахунку на сиру або суху масу [105]:

$$A = \frac{C \cdot V}{n \cdot 1000}, \quad (2.11)$$

де:  $A$  – вміст пігментів у дослідному зразку;  $C$  – концентрація пігменту, знайдена за формулою Ветштейна, мг/дм<sup>3</sup>;  $V$  – об'єм екстракту, см<sup>3</sup>;  $n$  – навіска дослідного зразка, г; 1000 – коефіцієнт для перерахунку концентрації пігментів на 1 см<sup>3</sup>.

### 2.5.6. Визначення загального вмісту меланінів

Визначення вмісту меланінів проводили шляхом лужного гідролізу міцелію з подальшим осадженням концентрованою  $\text{HCl}$ . Загальний вміст пігменту визначали спектрофотометричним методом та розраховували за допомогою калібрувальної кривої (за пірокатехіном). Вміст меланіну в культуральному фільтраті визначали прямим фотоколориметруванням КФ [40].

Меланінові пігменти ідентифікували за допомогою якісних реакцій з  $\text{KMnO}_4$  (при додаванні розчину  $\text{KMnO}_4$ , колір лужного розчину меланіну змінювався з коричневого на зелений з подальшим знебарвленням розчину і утворенням осаду. Розчини препаратів меланіну в 0,1 N  $\text{NaOH}$  в присутності 10%  $\text{H}_2\text{O}_2$  окислювались та знебарвлювались [40].

### 2.5.7. Визначення вмісту водорозчинних білків та продуктивності синтезу білків

Вміст водорозчинних білків у живильних середовищах, культуральній рідині і міцелію визначали спектрофотометричним методом Варбурга-Христіана на спектрофотометрі при довжині хвилі 260 нм и 280 нм. Кількість білку в  $\text{мг/см}^3$  знаходили по номограмі [105].

Продуктивність синтезу білків ( $\text{ПСБ}$ ) на 1 г міцелію визначали за формулою:

$$\text{ПСБ} = \frac{B_x - B_o}{m} \quad (2.12)$$

де:  $B_x$  – кількість білку (мг) в 1  $\text{см}^3$  культурального фільтрату;  $B_o$  – кількість білку (мг) в 1  $\text{см}^3$  стерильного живильного середовища до інокулювання;  $m$  – маса сухого міцелію, отримана в розрахунку на 1  $\text{см}^3$  живильного середовища, г.

### 2.5.8. Визначення каталазної активності

Каталазну активність визначали у міцелії (водна витяжка, на одиницю маси, г) та культуральному фільтраті (на одиницю об'єму, см<sup>3</sup>) спектрофотометричним методом, який заснований на здатності пероксиду водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі, при довжині хвилі 410 нм супроти нульової проби з дистильованою водою. За одиницю активності каталази приймали ту кількість ферменту, яка бере участь у перетворенні 1 мкат перекису водню за 1 секунду при заданих умовах. Каталазну активність розраховували за формулою [50]:

$$KA = (A_k - A_d) \cdot V \cdot t \cdot k \cdot p \text{ (мкат/ дм}^3\text{)}, \quad (2.13)$$

де:  $KA$  – каталазна активність (мкат/ дм<sup>3</sup>),  $A_k$  та  $A_d$  – екстинкція контрольної та дослідної проб,  $V$  – об'єм проби, що вносили (0,1 см<sup>3</sup>),  $t$  – час інкубації (600 с),  $k$  – коефіцієнт мілімолярної екстинкції пероксиду водню, що дорівнює  $22,2 \cdot 10^3 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ,  $p$  – коефіцієнт розведення.

Питому каталазну активність ( $KA_{пт}$ ) визначали за формулою [50]:

$$KA_{пт} = \frac{KA}{C_B}, \quad (2.14)$$

де:  $KA$  – каталазна активність культурального фільтрату або міцелію, мкат/ дм<sup>3</sup>;  $C_B$  – концентрація білку в 1 см<sup>3</sup> культурального фільтрату або гомогенату міцелію, мг/см<sup>3</sup>.

### 2.5.9. Визначення пероксидазної активності

Пероксидазну активність визначали у міцелію (водна витяжка, на одиницю маси, г) та культуральному фільтраті (на одиницю об'єму, см<sup>3</sup>). Метод базується на вимірі за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2 при довжині хвилі 460 нм в кюветі 10 мм, інтенсивності забарвлення продукту окиснення о-діанізидину перекисом водню. Одиниця активності

пероксидази відповідає кількості ферменту, що окиснює 1 мкм о-діанізидину за 1 хвилину. Пероксидазну активність мікологічного матеріалу розраховували за формулою [50]:

$$ПА = \frac{E \cdot V_1}{K_1 \cdot K_2 \cdot V_2 \cdot t} \cdot p, \quad (2.15)$$

де,  $E$  – екстинкція;  $V_1$  – об'єм забарвленої проби;  $V_2$  – об'єм КФ або МГ;  $K_1$  – коефіцієнт мікромолярної екстинкції (0,0128) ;  $K_2$  – коефіцієнт для перерахунку  $\text{см}^3$  у л (1000);  $t$  – час інкубації (5 хв.);  $p$  – розведення.

Питому пероксидазну активність ( $ПА_{\text{ПТ}}$ ) розраховували за формулою [50]:

$$ПА_{\text{ПТ}} = ПА / C_{\text{Б}}, \quad (2.16)$$

де:  $C_{\text{Б}}$  – концентрація білку у мг в 1  $\text{см}^3$  культурального фільтрату або гомогенату міцелію.

## 2.6. Методи отримання та дослідження складу грибних ферментних препаратів

Одержання грибних ферментних препаратів каталаз і пероксидаз здійснювали за схемою (рис. 2.4) шляхом фракційного висолювання білків культурального фільтрату чи екстракту, отриманому з гомогенату міцелію сульфатом амонію [68, 121, 144]. Використовували цей метод завдяки гарній розчинності у воді та стабілізуючій дії на білкову молекулу  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Фракцію білку, яка утворила осад, відділяли центрифугуванням на центрифугі ЦЛР-1 або ОПН-8, при охолодженні до  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ , відцентровому прискоренні 2000 g протягом 15 хвилин.

Первинну очистку отриманої білкової фракції проводили за допомогою діалізу проти охолодженої до  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  дистильованої води протягом 24 годин. Для прискорення дифузії, розчинник декілька разів замінювали до повного очищення розчину білків від сульфату амонію. Завдяки осмосу, молекули розчинника призводили до часткового розведення дослідного розчину білків.



Рис. 2.4. Етапи культивування штамів-продуцентів і отримання ферментних препаратів оксидоредуктаз (схема)

Отримані розчини фракцій білків піддавали ліофільній сушці на приладі “Иней 3-2” (рис. 2.5.).

Наступним етапом визначали ферментативну активність отриманих препаратів, які мали вигляд порошку від світло-сірого до світло-кремового забарвлення, добре розчинні у воді.

Кількісний вміст зв'язаних амінокислот і білка у грибних ферментних препаратах ферментів каталаз і пероксидаз визначали за допомогою амінокислотного аналізатора моделі ААА-881, після їх кислотного гідролізу [70].



Рис. 2.5. Ліофільна сушка грибних ферментних препаратів на установці “Иней 3-2”

## 2.7. Математичні методи, статистична обробка експериментальних даних

### 2.7.1. Математичні методи оптимізації складу живильних середовищ

Всі досліди можна розподілити на так звані активні, в яких дослідники використовують математичний апарат ще під час підготовки досліджень та

пасивні експерименти, коли дослідник використовує математичний апарат тільки наприкінці експерименту, тобто при обчисленні його результатів [94, 97, 98].

Задачі пасивного експерименту зводяться до збору матеріалу та добору методів статистичної обробки. Для математичної обробки пасивних експериментів використовуються методи дисперсійного, кореляційного, регресійного аналізів, що буде обговорено в п. 2.7.2.

З метою оптимізації складу живильних середовищ (багатофакторних комплексів) застосовували активні експерименти – математичне планування повного факторного експерименту, а саме – факторні плани  $2^k$ .

Після визначення основного, верхнього та нижнього рівнів факторів (вмісту певних речовин в живильному середовищі) складали план експерименту. В експериментах  $2^k$  фактори варіюють на двох рівнях. У зв'язку з цим можливе отримання лінійної моделі. Якщо відома кількість факторів, включених до експерименту, відразу можна підрахувати кількість дослідів за формулою:

$$N = 2^k \quad (2.17)$$

де:  $N$  – кількість необхідних дослідів;  $2$  – кількість рівнів фактора;  $k$  – кількість факторів, включених до експерименту.

У плані експерименту необхідно врахувати всі можливі сполучення рівнів факторів. В плануванні факторного експерименту рівні факторів позначаються  $+1$  (верхній рівень) та  $-1$  (нижній рівень). При побудові планів у матрицях одиниця звичайно пропускається. Таким чином у матрицях планів верхній рівень фактора позначається знаком „+”, а нижній рівень – знаком „-”. Умови експерименту записуються у вигляді таблиць, рядки яких відповідають дослідом, а стовпці – факторам. Крім того, до таблиці включають стовпці для середніх значень функції відгуку. Саме ці таблиці, які складали, і називають матрицями експерименту.

Способи статистичної обробки результатів повного факторного експерименту зводяться до обчислення коефіцієнтів рівняння лінійної



регресії типу  $\hat{y} = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2$ . Можна стверджувати, що експеримент здійснюється з метою перевірки гіпотези, що лінійна модель  $\mu = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2$  адекватна. Тобто в генеральній сукупності (на що вказують літери грецького алфавіту) з певною ймовірністю залежність змін функції відгуку буде відбуватися саме за такою формулою. Оскільки під час експерименту можна отримати лише вибіркові параметри, їх точність і надійність цілком залежать від властивостей вибірки і потребують статистичної перевірки. Тому виконувалася така послідовність статистичної обробки результатів експериментів: первинна статистична обробка результатів з перевітками усіх вибірок на нормальність розподілу та однорідність; перевірка вибірових середніх квадратів відхилень; оцінка значущості і коефіцієнтів рівняння регресії; обчислення коефіцієнтів рівняння регресії; перевірка адекватності рівняння регресії [94, 97, 98].

### 2.7.2. Статистична обробка експериментальних даних

Всі досліді проводили не менше ніж в трьохкратній повторності, виключенням є амінокислотний аналіз ферментних препаратів, де у ряді дослідів використовували один зразок препарату. Для обробки отриманих експериментальних даних використовували необхідні для проведення і аналізу мікологічних досліджень статистичні методи [2, 94].

Наступним етапом, для встановлення впливу факторів культивування, експериментальні дані обробляли з застосуванням дисперсійного аналізу та порівняння середніх за методами Дункана і Даннета. Достовірною вважалася різниця за  $P < 0,05$ . Обчислення проводили на комп'ютері з використанням пакету програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів та програм *Microsoft Excel* 2003 і *Statistica* 6.0 [94].

Отримані експериментальні данні, після статистичної обробки, представляли у вигляді:  $M \pm m$ , де:  $M$  – середня арифметична,  $m$  – похибка середньої арифметичної.

### РОЗДІЛ 3.

## РОСТОВІ ПОКАЗНИКИ ДОСЛІДЖУВАНИХ ШТАМІВ БАЗИДІЄВИХ ГРИБІВ

### 3.1. Накопичення біомаси штамами за стандартних умов культивування

При вивченні динаміки накопичення біомаси (рис. 3.1) і інших біосинтетичних показників, дослідні штами культивували в стандартних умовах: періодично поверхнево в колбах Ерленмеєра на глюкозо-пептонному живильному середовищі. Термін культивування при 27,5°C складав 12 діб. Параметри ферментації зумовлені технологічною і економічною недоцільністю довгострокового культивування та тривалістю фази експоненціального росту продуцентів [50, 121, 122].

Результати накопичення біомаси штамами базидієвих грибів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування підтверджують попередньо отримані дані та терміни фаз їх експоненціального росту [50, 161]. Всі досліджені штами досягають максимуму накопичення біомаси за значеннями АСБ на 12-ту добу культивування. За показником АСБ у 12-ти добовому віці, штами можна умовно розподілити на три групи (рис. 3.2).

Перша, найбільш чисельна група містить 32 штами з повільним ростом, які в запропонованих умовах культивування накопичують АСБ до 4 г/дм<sup>3</sup>. До другої групи відноситься 21 штама з АСБ від 4 до 8 г/дм<sup>3</sup>. Третя група нараховує 5 швидкозростаючих штамів Р-12к *P. ostreatus* ( $Q_x=2,83 \times 10^{-2}$  г/дм<sup>3</sup>×год), Р-203 *P. ostreatus* ( $Q_x=4,43 \times 10^{-2}$  г/дм<sup>3</sup>×год), D-140 *P. ostreatus* ( $Q_x=4,43 \times 10^{-2}$  г/дм<sup>3</sup>×год), Р-er *P. eryngii* ( $Q_x=5,86 \times 10^{-2}$  г/дм<sup>3</sup>×год) та F-610 *F. velutipes* ( $Q_x=5,93 \times 10^{-2}$  г/дм<sup>3</sup>×год), які розташовані в порядку наростання АСБ.

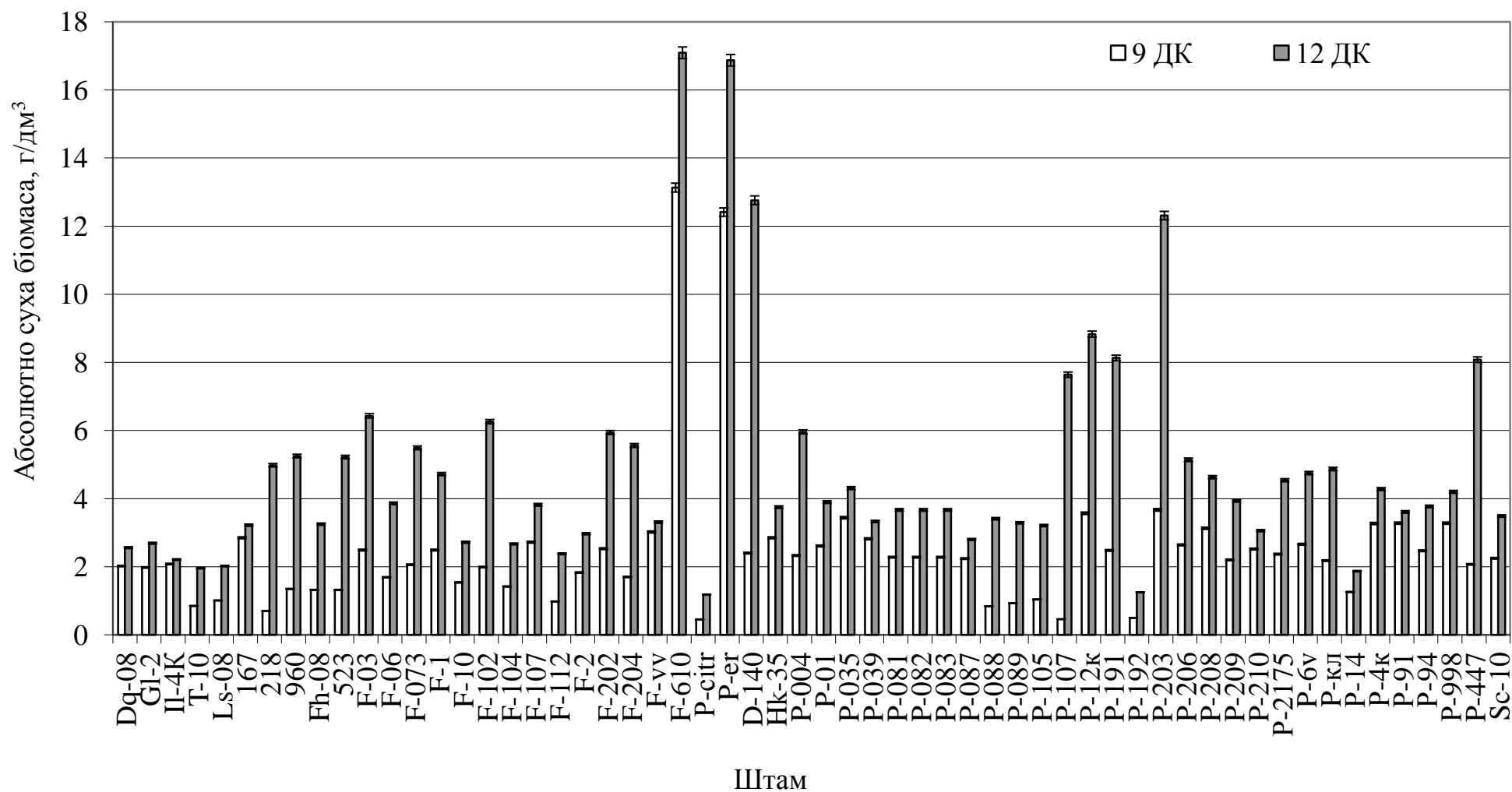


Рис. 3.1. Накопичення біомаси штамами базидієвих грибів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування

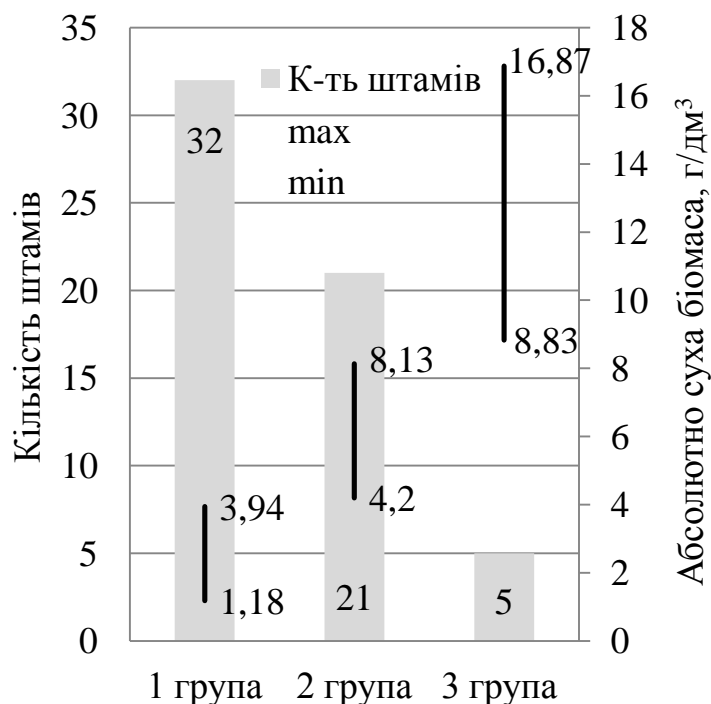


Рис. 3.2. Розподіл штамів базидієвих  
грибів за рівнем накопичення біомаси  
на 12-ту добу культивування

### Висновки до розділу 3

1. Досліджені штами мають індивідуальні значення росту – накопичення абсолютно сухої біомаси в застосованих умовах культивування.
2. Виявлені значні коливання цього показника в межах одного виду, що пояснюється індивідуальною мінливістю штамів.
3. Найпродуктивніші за ростовим показником штами F-610 *F. velutipes*, D-140, P-203 і P-12к *P. ostreatus* та P-er *P. eryngii* можуть бути рекомендовані для застосування в біотехнології отримання міцелію їстівних базидієвих грибів.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в 3 публікаціях – статтях у фахових виданнях [50, 156, 161].

## РОЗДІЛ 4.

### БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ІНТЕНСИФІКАЦІЇ ПРОЦЕСІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ ШТАМІВ БАЗИДІЄВИХ ГРИБІВ

Одним із ключових факторів життєдіяльності клітин аеробних організмів є взаємодія активних форм кисню (АФК) і антиоксидантів [17, 32, 47]. АФК утворюються в системах транспорту й утилізації кисню, є ланкою багатьох метаболічних процесів і виконують найважливіші регуляторні функції [47, 266]. Приміром, АФК ініціюють реакції перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) – складову частину кисневого режиму, де основним субстратом є поліненасичені жирні кислоти. Внаслідок надмірного утворення АФК, що мають високу реакційну здатність, або недостатності клітинних механізмів антиоксидантного захисту виникає дисбаланс в прооксидантно-антиоксидантній системі. В результаті цього розвивається окислювальний стрес, що приводить до значних порушень в нормальному метаболізмі та активізації низки патогенних процесів [266]. Зокрема, має місце окисна модифікація клітинних мембран та накопичення токсичних і хімічно активних продуктів окисної модифікації біомолекул (малоновий діальдегід (МДА) та ін.). Це викликає численні біосинтетичні та структурні порушення і як кумулятивний результат – руйнування клітини [17, 135]. Взагалі, окислювальний стрес є загальною реакцією на дію багатьох факторів: зміну рН, температури і осмотичного тиску; концентрацію компонентів субстрату; висушування і механічні пошкодження; наявність (інтенсивність) світла та іонізуючої радіації тощо [47, 135].

До руйнування лігноцелюлозного комплексу деревини залучені складні ферментні комплекси прооксидантно-антиоксидантної системи ксилотрофів. Вони генерують позаклітинні хімічно нестабільні АФК, які викликають спонтанні вільнорадикальні ланцюгові реакції руйнування складних та хімічно стійких біополімерів і їх подальший метаболізм [283, 405]. Ці реакції

не мають субстратної специфічності, тому перспективним є залучення ксилотрофних базидієвих грибів до процесів біоремедіації забруднених середовищ і розкладання відходів ряду галузей промисловості та сільського господарства [219, 220, 258, 405].

Отже, рівень інтенсивності процесів ПОЛ, як частини прооксидантно-антиоксидантної системи, має закономірні характеристики. Він відображає загальну стійкість організму і визначає межі його витривалості до зовнішніх впливів. Адаптивна активація процесів ПОЛ може слугувати маркером окислювального процесу і призводити до порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в клітині [13, 240]. Є експериментальні дані щодо використання показників інтенсивності ПОЛ в діагностиці певних процесів у біотехнології і екології [240].

Виходячи з вищезазначеного, на цьому етапі роботи встановлювали та порівнювали показники росту та інтенсивності процесів перекисного окислення ліпідів штамів базидієвих грибів.

#### **4.1. Самочинна і індукована інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів**

Визначали самочинну інтенсивність процесів ПОЛ міцелію, культурального фільтрату і інші показники прооксидантно-антиоксидантної системи штамів.

З'ясовано, що самочинна інтенсивність процесів ПОЛ міцелію (рис. 4.1.) всіх штамів значно вища за цей показник КФ (рис. 4.2.). Інтенсивність процесів ПОЛ міцелію нарастає з віком культури, що можна пояснити зростаючою нестачею певних живильних речовин (перш за все вуглецевмісних) та збільшенням кількості і концентрації продуктів метаболізму в культуральній рідині.

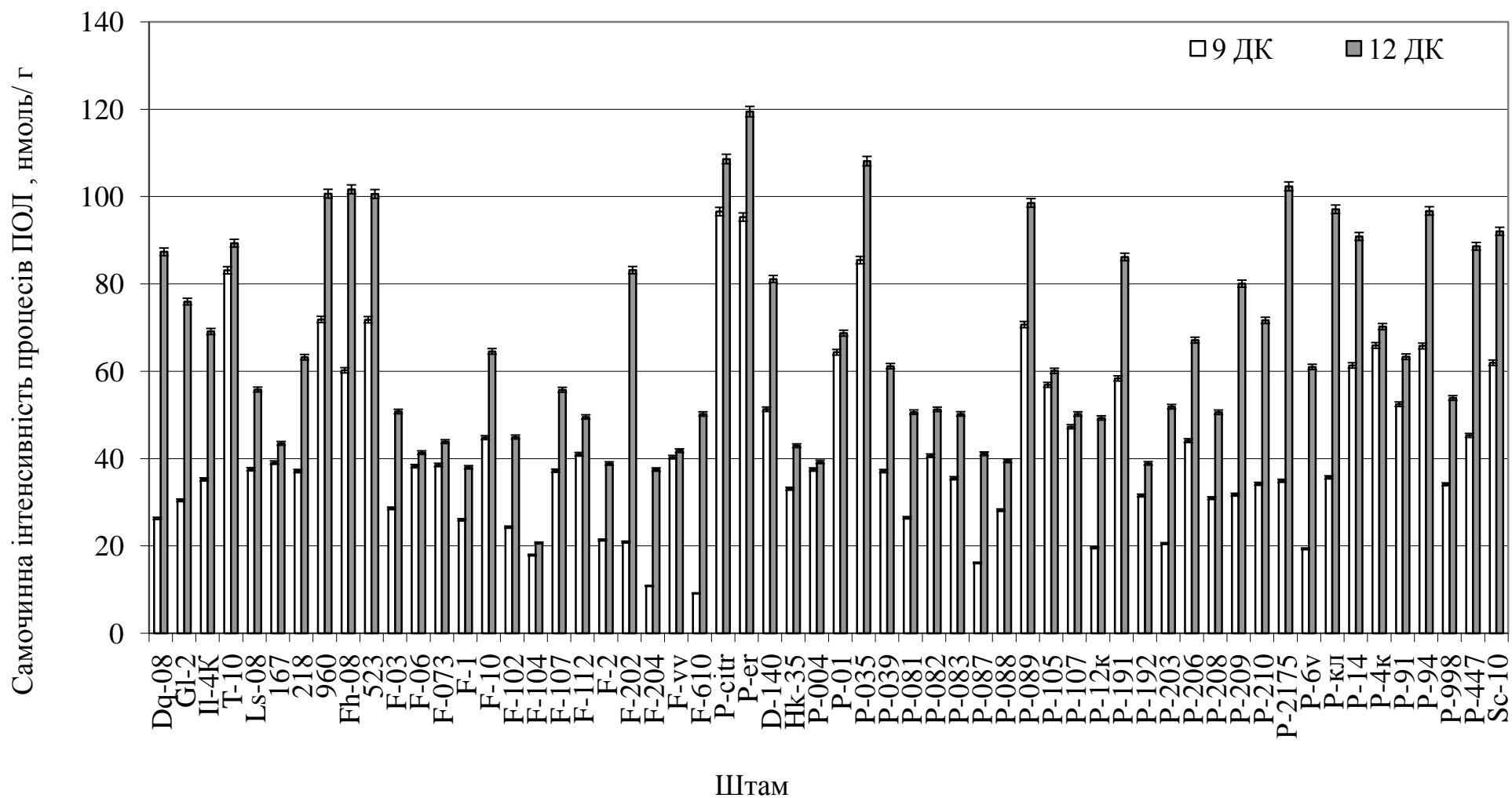


Рис. 4.1. Самочинна інтенсивність процесів ПОЛ міцелію штамів базидієвих грибів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування

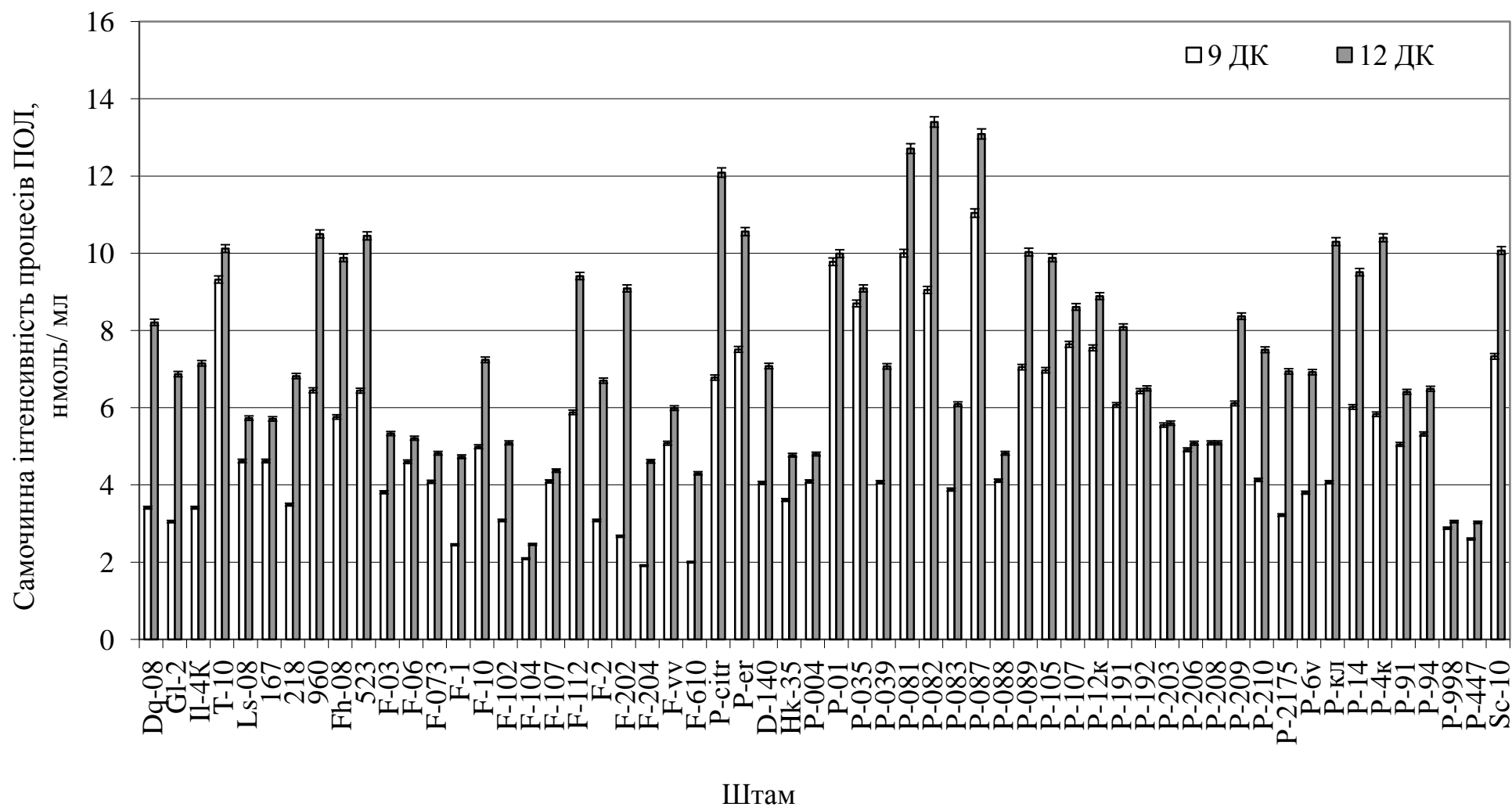


Рис. 4.2. Самочинна інтенсивність процесів ПОЛ КФ штамів базидієвих грибів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування



За рівнем самочинної інтенсивності процесів ПОЛ 12-ти добового міцелію, досліджувані штами можна розподілити на три умовні групи (рис. 4.3).

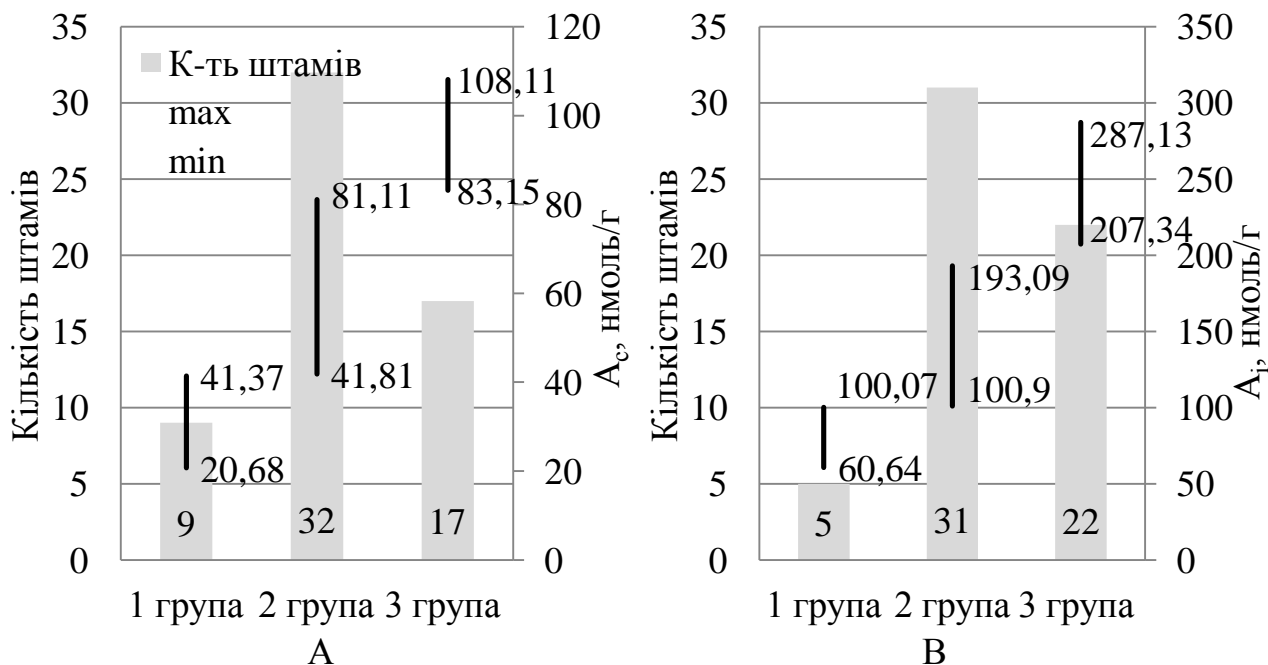


Рис. 4.3. Розподіл штамів базидієвих грибів за рівнем самочинної (А) та індукованої (В) інтенсивності процесів ПОЛ міцелію на 12-ту добу культивування

До першої групи, з низьким рівнем самочинної інтенсивності процесів ПОЛ – нижче 40 нмоль /г АСБ, відносяться 9 штамів. Зафіксовані значення  $A_c$ , ймовірно, пов'язані з незначними показниками їх росту та відповідних біосинтетичних процесів. Найбільш чисельна група, з помірними значеннями  $A_c$  від 40 до 80 нмоль/г АСБ включає 32 штами. В третю умовну групу можна віднести 17 культур з високим вмістом ТБК-АП – понад 80 нмоль/г. Це штами різної систематичної приналежності Dq-08 *D. quercina*, T-10 *F. fomentarius*, 960 *A. cylindracea*, 523 *L. edodes*, Fh-08 *F. hepatica*, F-202 *F. velutipes*, P-citr *P. citrinopileatus*, P-er *P. eryngii*, P-035, P-089, P-191, P-кл, P-14, P-94, P-447 і P-2175 *P. ostreatus* та Sc-10 *S. commune*. Виходячи з зафіксованої високої інтенсивності процесів ПОЛ, ці культури мають

перспективи використання у біотехнологіях деструкції хімічно стійких сполук.

Вміст продуктів ПОЛ в КФ штамів значно нижчий за такий у міцелії та має тенденцію до їх збільшення на 12-ту добу культивування. Цьому є декілька причин: по-перше, клітини активно регулюють синтез та потрапляння цих продуктів назовні, по-друге, позаклітинні ензими і хімічно нестабільні АФК викликають спонтанні вільнорадикальні ланцюгові реакції руйнування сполук і їх подальший метаболізм, по-третє, ГПС не містить складних і хімічно стійких біополімерів, перетравлення яких інтенсифікувало б екзогенні процеси ПОЛ.

Результати визначення вмісту продуктів ПОЛ в КФ дозволяють виділити культури, де рівень ТБК-АП значно перевищує середні значення і перевищує позначку в  $10 \text{ нмоль/см}^3$ . Це штами 960 *A. cylindracea*, 523 *L. edodes*, P-citr *P. citrinopileatus*, P-er *P. eryngii*, P-081, P-082, P-087, P-кл і P-4к *P. ostreatus*. Названі культури, разом зі штамами з високою інтенсивністю ПОЛ міцелію, мають перспективи використання у біотехнологіях деструкції хімічно стійких сполук.

Індукція процесів ПОЛ виявляє ті або інші токсичні властивості речовин-ініціаторів чи продуктів ПОЛ, або показує стійкість (чи реакцію) проби до таких впливів [163]. Її результати дають обґрунтування використання показників прооксидантно-антиоксидантної системи, в т.ч. інтенсивності процесів ПОЛ, в діагностиці певних процесів у біотехнології, медицині і екології.

Результати індукованої інтенсивності процесів ПОЛ міцелію (рис. 4.4) та КФ (рис. 4.5) штамів виявили різну відповідь мікологічного матеріалу на дію індуктора. У всіх варіантах дослідження спостерігалась особня для кожного штаму активація процесів ПОЛ. Як наслідок, співвідношення значень індукованої та самочинної інтенсивності процесів ПОЛ є індивідуальним для кожного штаму і не залежить від його систематичного положення.

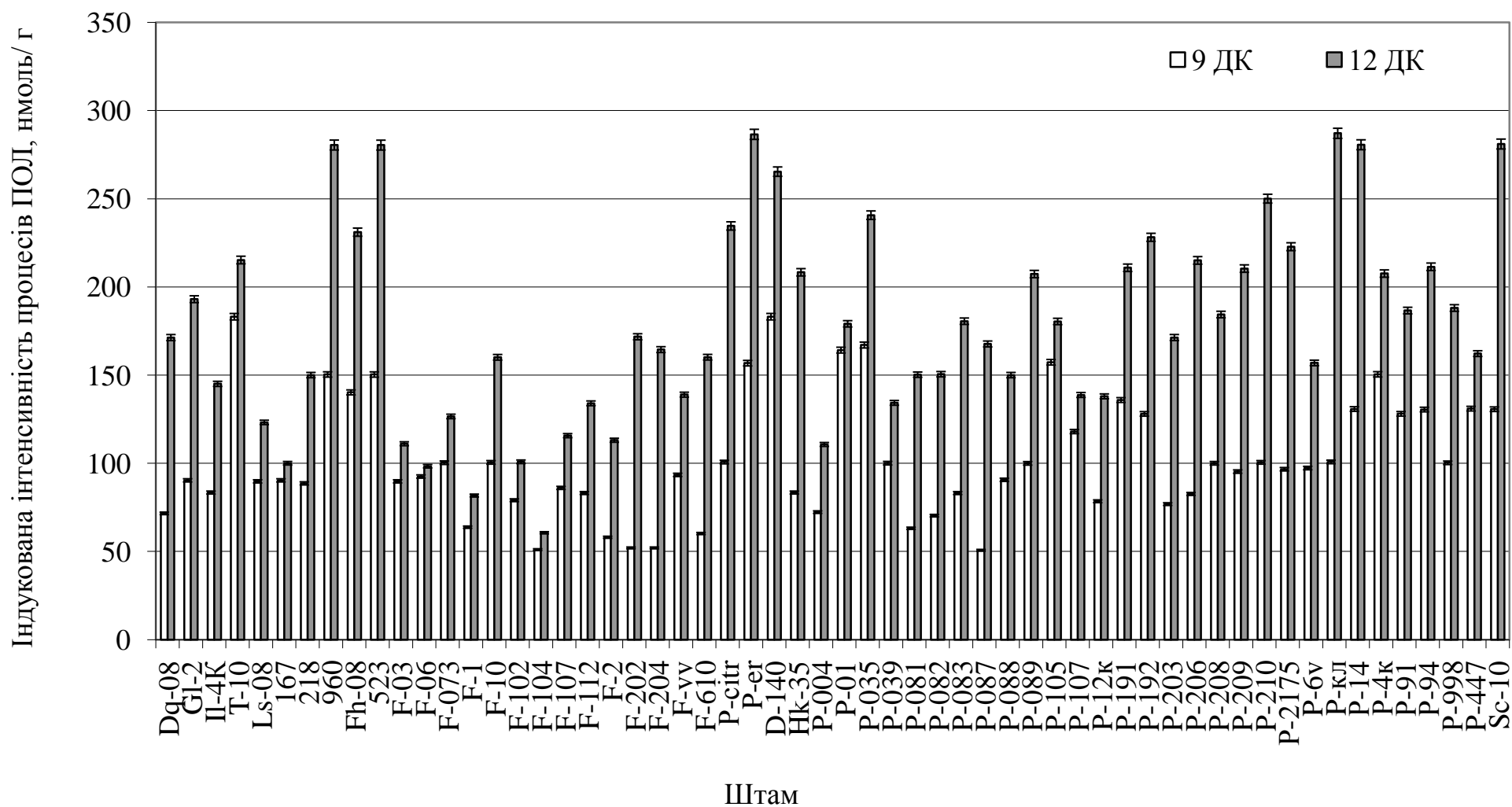


Рис. 4.4. Індукована інтенсивність процесів ПОЛ міцелію штамів базидієвих грибів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування

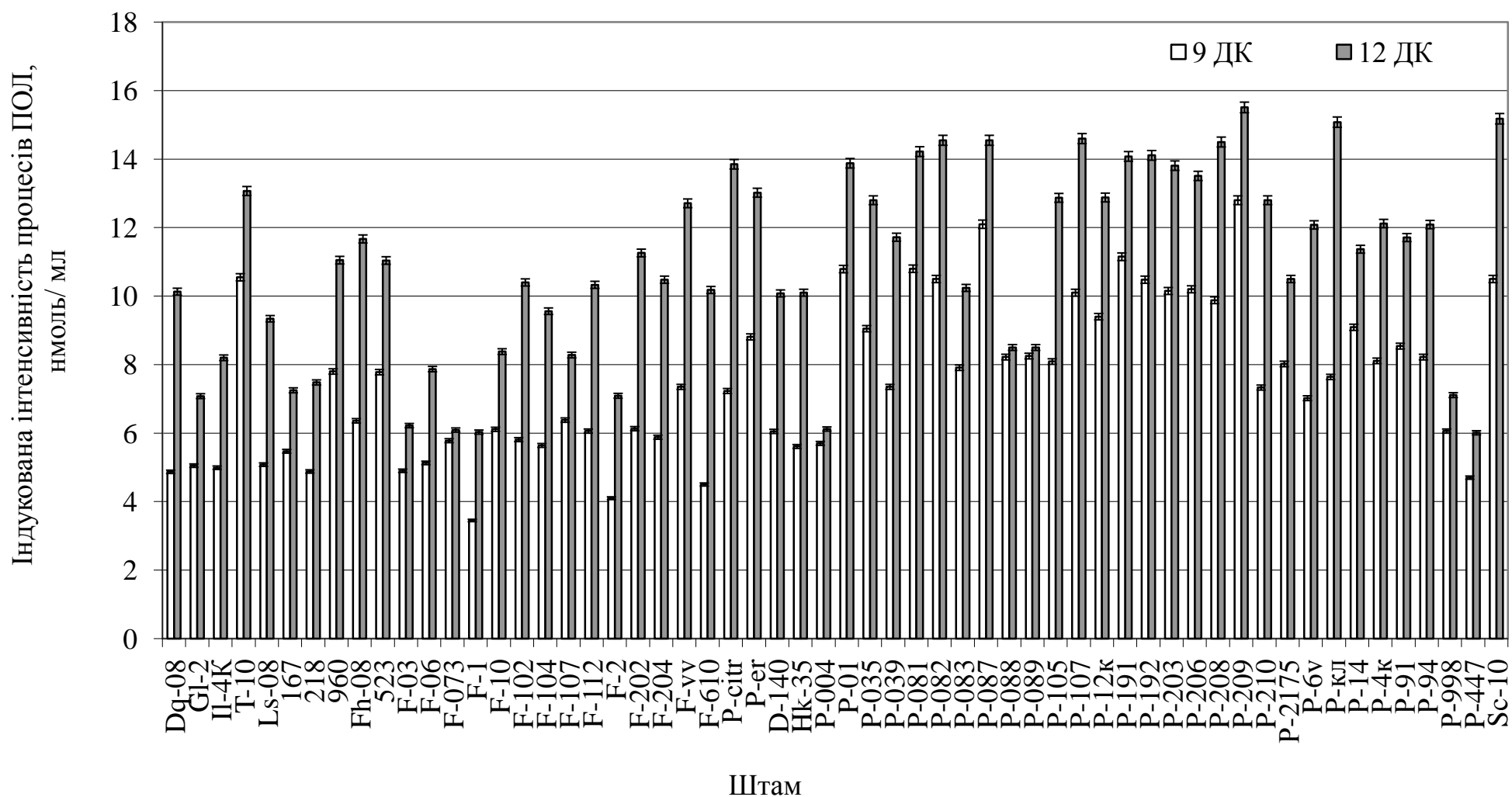


Рис. 4.5. Індукована інтенсивність процесів ПОЛ КФ штамів базидієвих грибів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування

Таким чином, експериментальні дані самочинної та індукованої інтенсивності процесів ПОЛ штамів базидієвих грибів у 9-ти та 12-ти добовому віці при поверхневому періодичному культивуванні на ГПС дозволяють стверджувати, що ці процеси мають осібний рівень і плин. Виявлені групи культур базидієвих грибів з різним рівнем вмісту продуктів ПОЛ. Самочинна та індукована інтенсивність процесів ПОЛ в міцелії всіх досліджених штамів суттєво вища за цей показник в КФ. Інтенсивність процесів ПОЛ як міцелію, так і КФ нарастає з часом культивування, що можна пояснити зростаючою нестачею певних поживних речовин (перш за все вуглецевмісних) та збільшенням кількості і концентрації продуктів метаболізму в середовищі.

Співвідношення значень індукованої та самочинної інтенсивності процесів ПОЛ є індивідуальним для кожного штаму і не залежить від його систематичного положення. Зміщення  $A_c$ - $A_i$  рівноваги відносно самочинного (стаціонарного) рівня ПОЛ є ознакою розвитку стрес-реакції. При цьому продукти ПОЛ можуть бути як індукторами, так і первинними медіаторами стресу як особливого стану біологічної системи. За результатами цього дослідження, низка визначених штамів з високими рівнем та індукцією процесів ПОЛ можуть бути рекомендовані до залучення у біотехнологіях деструкції хімічно стійких сполук чи індикації певних процесів і забруднень.

#### **4.2. Вплив хімічних речовин на інтенсивність та можливість регуляції процесів ПОЛ штамів базидієвих грибів**

Як зазначалось, активація процесів ПОЛ є неспецифічним компонентом реакції організму на будь-які впливи, нетипові за силою і тривалістю. При цьому недостатність систем антиоксидантного захисту сприяє збільшенню ступеня вираженості цієї реакції. Підвищене утворення вільних радикалів в організмі та зв'язане з цим посилення процесів пероксидації ліпідів (яке іноді називають «кисневим стресом»)

супроводжується низкою порушень у властивостях біологічних мембран і функціонуванні клітин. Кисневий стрес може проявлятися на рівні клітин, тканин та організму.

Оскільки особливо важливе значення процеси ПОЛ відіграють у життєдіяльності ксилотрофів, а процес розкладання лігніну і похідних полімерів каталізується лігнолітичними ферментами та має вільнорадикальний характер, наступним етапом вивчали характер впливу певних хімічних речовин на інтенсивність ПОЛ штамів P-er *P. eryngii*, Fh-08 *F. hepatica* та 960 *A. cylindracea* (рис. 4.6)

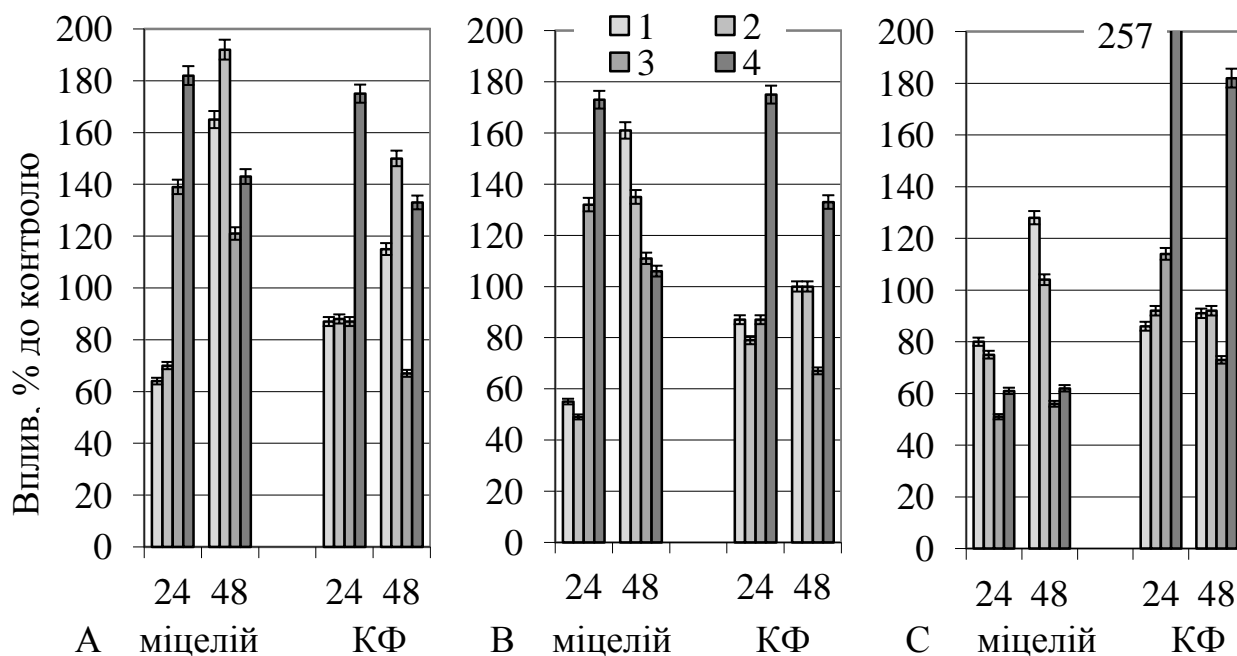


Рис. 4.6. Вплив таніну (1), лігносульфонату натрію (2), галової кислоти (3) та перекису водню (4) на інтенсивність процесів ПОЛ штамів P-er *Pleurotus eryngii* (A), Fh-08 *Fistulina hepatica* (B) та 960 *Agrocybe cylindracea* (C)

Штами культивували в стандартних умовах при 27,5 °C на ГПС. На 10-ту добу культивування у дослідні колби вносили стерильні водні розчини лігносульфонату натрію, таніну і галової кислоти до концентрації 0,1% та перекису водню до концентрації 0,01%; у контрольні – стерильну

дистильовану воду в рівних об'ємах. Інтенсивність перекисного окислення ліпідів в КФ і міцелії вимірювали через 24 і 48 годин експозиції речовин.

Зареєстровано індивідуальну реакцію ПОЛ культур на речовини і час їх експозиції. Виявлена можливість регуляції процесів ПОЛ хімічними факторами культивування. Найвищий ступінь індукції процесів ПОЛ зафіксовано при додаванні: таніну – на 161%, через 48 годин експозиції, в міцелії штаму Fh-08; лігносульфонату натрію – на 192%, 48 год., в міцелії штаму P-er; галової кислоти – на 182%, 24 год., в міцелії штаму P-er; перекису водню – на 257%, 24 год., в КФ штаму 960. Біотехнологічне значення цього – можливість регуляції (індукція чи репресія) ПОЛ штамів-продуцентів.

#### Висновки до розділу 4

1. Процеси ПОЛ мають певний індивідуальний для кожного штаму рівень, плин і відгук на дію факторів середовища. Активність та вміст продуктів ПОЛ в міцелії всіх штамів значно вищий таких показників культуральної рідини.
2. Штами різної систематичної приналежності з високим вмістом продуктів ПОЛ (понад 80 нмоль/г) – Dq-08 *D. quercina*, T-10 *F. fomentarius*, 960 *A. cylindracea*, 523 *L. edodes*, Fh-08 *F. hepatica*, F-202 *F. velutipes*, P-citr *P. citrinopileatus*, P-er *P. eryngii*, P-035, P-089, P-191, P-кл, P-14, P-94, P-447 і P-2175 *P. ostreatus* та Sc-10 *S. commune* перспективні до використання у біотехнологіях деструкції хімічно стійких сполук.
3. Вплив хімічних речовин на процеси ПОЛ не пов'язаний з функціонуванням лише одного відповідного адаптаційного механізму [121]. У клітинах організму функціонує комплекс індукованих реакцій, який контролюється складними регуляторними шляхами, тобто існує система інтегральних механізмів (до яких відноситься і прооксидантно-

антиоксидантна) стійкості до факторів середовища.

4. Вивчення опірних реакцій при дії різноманітних факторів дає можливість з нових позицій підійти до вирішення багатьох ключових проблем біології. Зокрема, ці дослідження важливі і для розвитку біотехнології, оскільки організми-продуценти потрібно розглядати як об'єкти, властивості яких змінюються залежно від умов середовища і дозволяють регулювати біотехнологічні процеси.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в 7 публікаціях – статтях у фахових виданнях [132, 141, 147, 148, 154, 160] та матеріалах конференції [159].



**РОЗДІЛ 5.**  
**БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ РЕГУЛЯЦІЇ**  
**АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ШТАМІВ ГРИБІВ**  
**ПОРЯДКІВ *AGARICALES* S.L. ТА *POLYPORALES* S.L.**

Гомеостаз та фізіологічний стан аеробних організмів визначаються сталим розвитком прооксидантно-антиоксидантного балансу – взаємодією активних форм кисню (АФК) і антиоксидантів. Порушення цього балансу в бік активації процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та зниження антиоксидантного захисту (АОЗ) веде до розвитку певних патологічних станів [13, 240]. Швидкість утворення і накопичення прооксидантів врівноважуються на певному рівні синтезом та активністю ендо- і екзогенних антиоксидантів. Через те, для характеристики організмів чи їх станів використовується поняття антиоксидантний статус. Для його виміру застосовують такі показники, як активність оксидоредуктаз, вміст окремих антиоксидантів чи продуктів ПОЛ, склад ліпідів чи співвідношення окремих фракцій фосфоліпідів та інші дані. Узагальнюючим показником антиоксидантного статусу є рівень загальної антиоксидантної активності (АОА) [129]. Цей показник може характеризувати не тільки певні організми чи їх групи, а й інформувати про стан екологічних систем чи біотехнологічних процесів.

Корекція прооксидантно-антиоксидантного балансу шляхом поповнення запасів антиоксидантів ззовні певними продуктами харчування чи лікувально-профілактичними препаратами може значно знизити ступінь прояви оксидантного стресу. Однак, перелік природних продуктів (*natural product-based drug discovery* – NPDD), багатих на антиокисні речовини обмежений. У зв'язку з цим, доцільним є пошук нових активних продуцентів природних антиоксидантів.

Доведено, що базидіальні гриби здатні до синтезу та накопичення повноцінного протеїну та численних біологічно активних речовин.

Приміром, їх складні ензимні комплекси прооксидантно-антиоксидантної системи задіяні в біотрансформації складних та хімічно стійких біополімерів, що має промислове та екологічне значення [258, 283]. Розробляються способи культивування їстівних і лікарських видів макроміцетів та виділення їх метаболітів [21, 90, 211, 335, 337, 398]. Це поліцукри, поліфеноли і терпени, полікетиди і стероїди, вітаміни і вітаміноподібні речовини, тощо [129]. Їх терапевтична дія, в першу чергу, обумовлена антиоксидантною активністю – здатністю до поглинання (*scavenging*) вільних радикалів, модуляції активності ферментів шляхом хелатування металів та інгібування окислення ліпідів [129]. Дослідження показали, що грибні метаболіти, в тому числі антиоксиданти мають високий рівень біодоступності і здатні швидко метаболізуватися в організмі [129, 168]. Вживання грибів з великою концентрацією антиоксидантів зумовлює появу в плазмі крові біоактивних метаболітів, що, в свою чергу, підвищує її антиоксидантну активність [129].

Виходячи з вищезазначеного, метою цього етапу роботи було встановлення та порівняння загальної антиоксидантної активності штамів базидієвих грибів.

### **5.1. Загальна антиоксидантна активність міцеліальних культур базидієвих грибів**

Зареєстрований рівень ще одного показника ПАС – загальна антиоксидантна активність міцелію (рис. 5.1) та КФ (рис. 5.2) досліджуваних штамів показує наступне.

У всіх варіантах дослідів спостерігали вікове зростання показника АОА, що пояснюється знаходженням культур в експоненціальній фазі росту.

При цьому фіксували індивідуальне для кожного штаму зниження рН культуральної рідини.

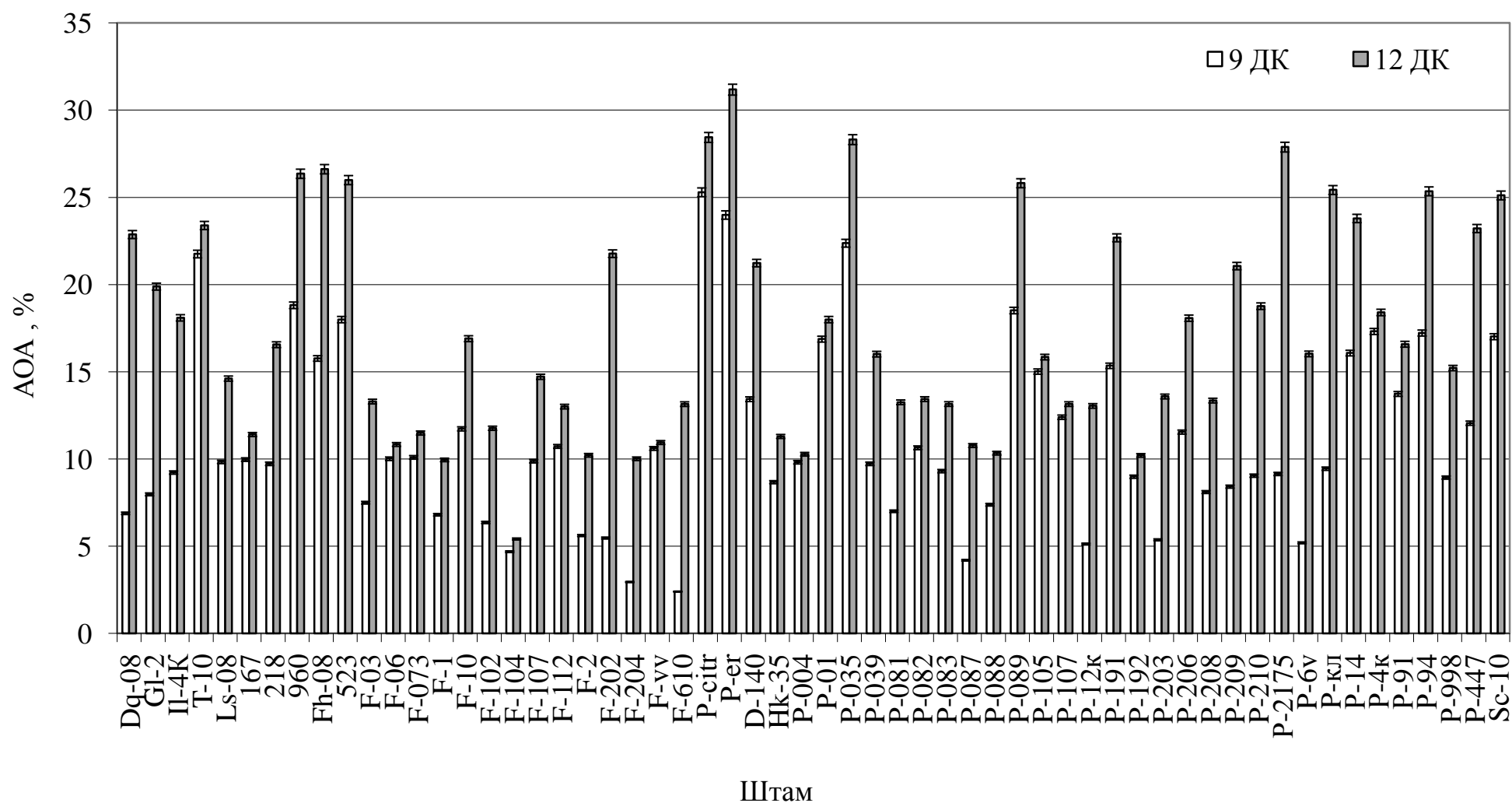


Рис. 5.1. Загальна антиоксидантна активність міцелію штамів базидієвих грибів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування

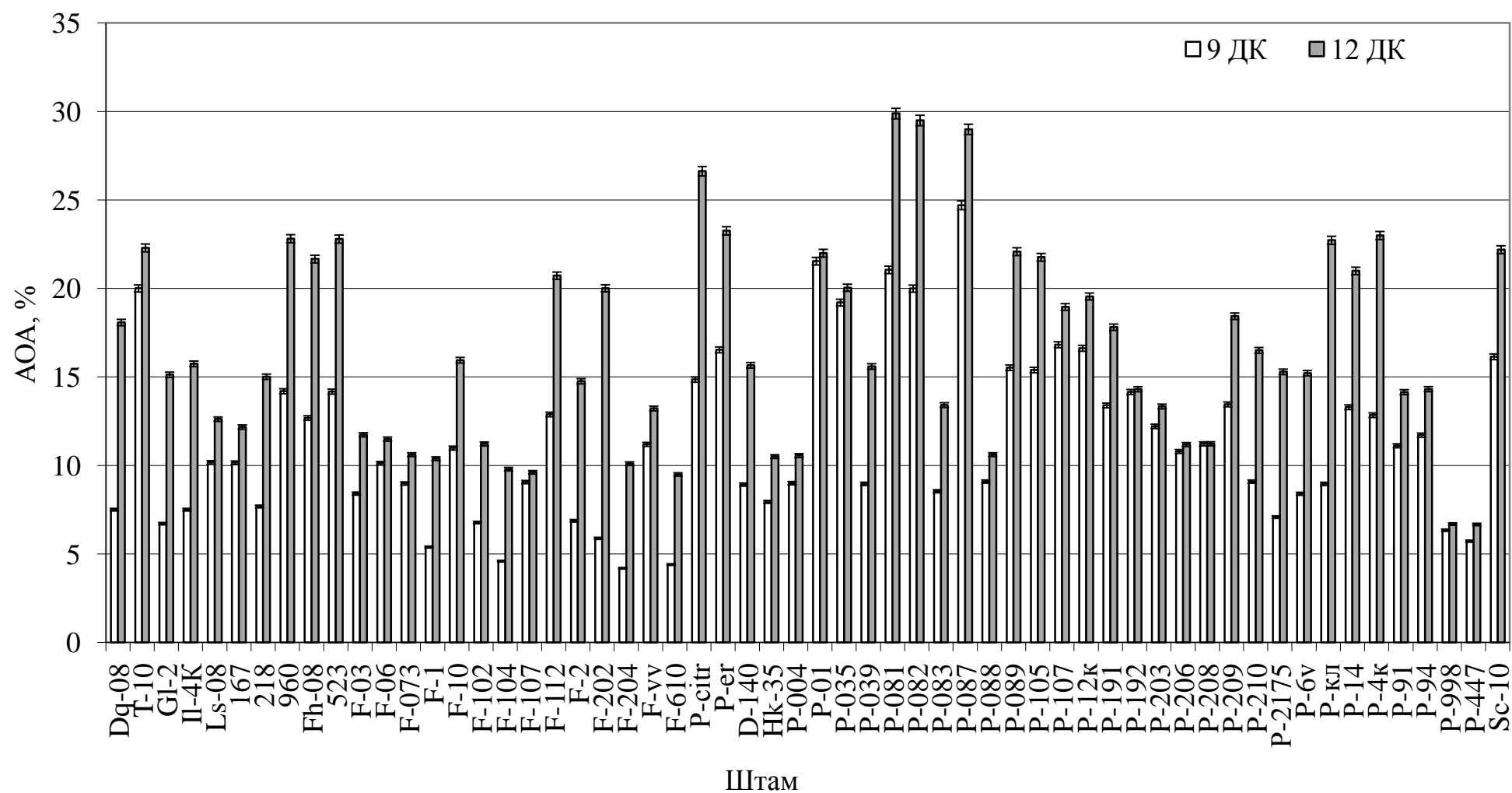


Рис. 5.2. Загальна антиоксидантна активність КФ штамів базидієвих грибів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування

Це відбувається внаслідок декількох причин: по-перше, поглинанням кисню та виділенням  $\text{CO}_2$  культурою і утворенням карбонатної кислоти –  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , по-друге, біосинтезом сполук кислоти природи, по-третє, вичерпанням з різною швидкістю поживних речовин та поступовим накопиченням в культуральній рідині продуктів метаболізму. В подальшому, вказані процеси негативно впливатимуть на ріст та продуктивність міцеліальних культур базидієвих грибів, чого можна уникнути переходом на керований глибинний спосіб їх культивування.

За значеннями загальної АОА міцелію на 12-ту добу росту, штами умовно поділяються на три групи (рис. 5.3).

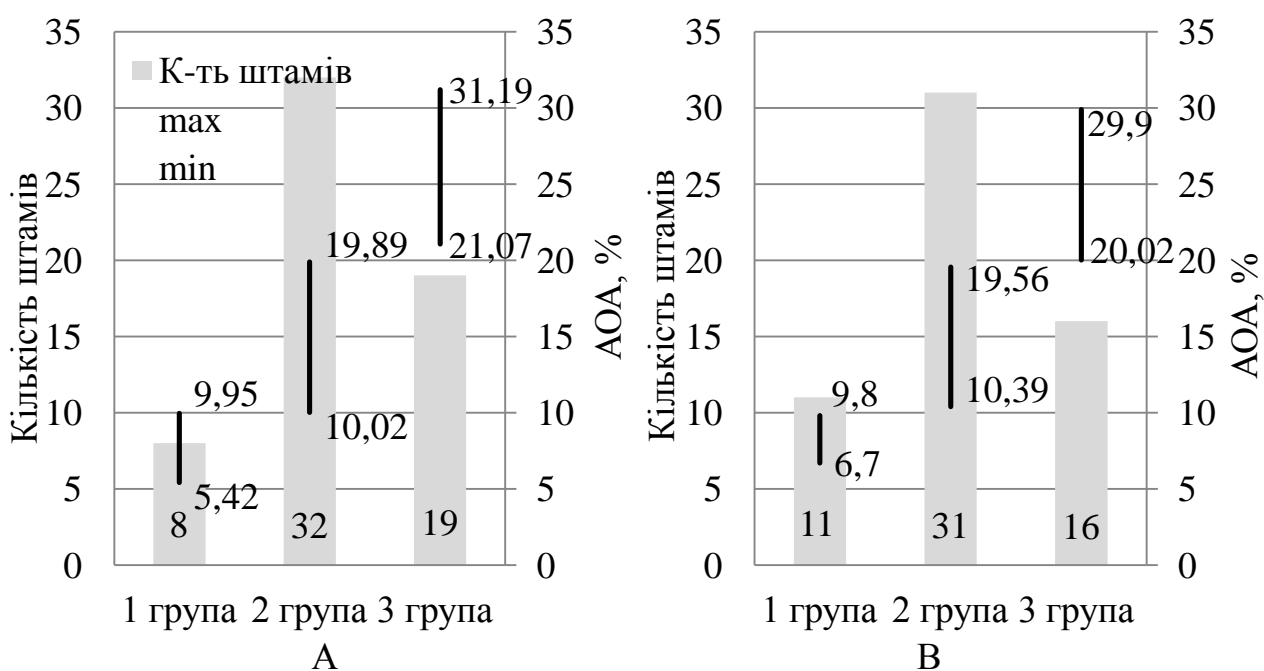


Рис. 5.3. Розподіл штамів базидієвих грибів за рівнем загальної антиоксидантної активності міцелію (А) та культурального фільтрату (В) на 12-ту добу культивування

На увагу тут заслуговує група штамів з високим рівнем АОА міцелію, що перевищує позначку 20%. До неї відносяться 19 штамів: Dq-08 *D. quercina*, T-10 *F. fomentarius*, 960 *A. cylindracea*, 523 *L. edodes*, Fh-08 *F. hepatica*, F-202 *F. velutipes*, P-citr *P. citrinopileatus*, P-er *P. eryngii*, P-035, D-

140, P-089, P-191, P-209, P-кл, P-14, P-94, P-447 і P-2175 *P. ostreatus* та Sc-10 *S. commune*. Лідером серед цих культур є штам P-er *P. eryngii*, далі в порядку зниження АОА йдуть штами P-citr *P. citrinopileatus*, P-035 *P. ostreatus*, Fh-08 *F. hepatica*, 960 *A. cylindracea*, які можуть бути рекомендовані як продуценти міцеліальних антиоксидантів та АО функціональних продуктів. Встановлено високу загальну АОА КФ, яка обумовлена екстрацелюлярними метаболітами штамів базидієвих грибів та розподілення штамів за цим показником.

У групу з найвищими значеннями АОА КФ – понад 20%, входять 16 штамів: T-10 *F. fomentarius*, 960 *A. cylindracea*, 523 *L. edodes*, Fh-08 *F. hepatica*, P-citr *P. citrinopileatus*, P-er *P. eryngii*, P-01, P-081, P-082, P-087, P-089, P-105, P-кл, P-14 і P-4к *P. ostreatus* та Sc-10 *S. commune* – потенційні продуценти біотехнології позаклітинних антиоксидантів. Лідерами тут є штами роду *Pleurotus*: P-081, P-082, P-087 та P-citr. Варто відмітити, що в цю групу не входить жодний штам роду *Flammulina*.

Таким чином, визначення та порівняння загальної АОА дозволили виявити найпродуктивніші штами базидієвих грибів за рівнем цього показнику міцелію: P-er *P. eryngii*, > P-citr *P. citrinopileatus*, > P-035 *P. ostreatus*, > Fh-08 *F. hepatica* > 960 *A. cylindracea*. Лідерами за рівнем загальної АОА КФ є штами: P-081 > P-082 > P-087 *P. ostreatus* > P-citr *P. citrinopileatus*. Не встановлено залежності між реєстрованими показниками АСБ та АОА 9-ти та 12-ти добових культур грибів. Біосинтетично активні штами базидієвих грибів – продуценти природних антиоксидантів можуть бути використані в якості біологічних агентів у біотехнології функціональних продуктів.

## **5.2. Вплив хімічних речовин та можливість регуляції антиоксидантної активності штамів базидієвих грибів**

На ростові та біосинтетичні характеристики штамів-продуцентів впливають численні фактори. Насамперед, це температура та спосіб і

прийоми культивування; наявність і концентрація певних компонентів середовища [20, 22]. Можемо припустити, що характерні сполуки, які входять до складу лігноцелюлозного комплексу деревини чи продукти її розкладу певною мірою впливають (або регулюють) прооксидантно-антиоксидантну систему ксилотрофів.

Входячи з цього припущення, наступним етапом виконання цього розділу роботи було вивчення характеру впливу хімічних речовин на АОА біосинтетично активних штамів Р-ер *P. eryngii*, Fh-08 *F. hepatica* та 960 *A. cylindracea* (рис. 5.4).

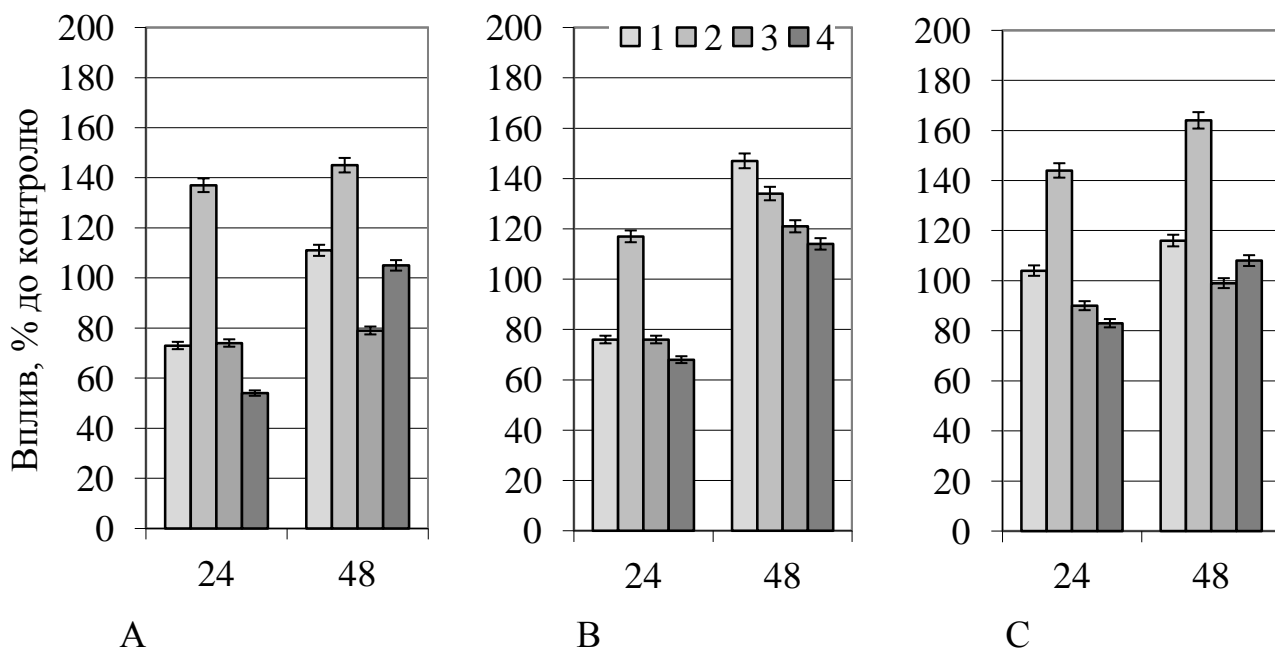


Рис. 5.4. Вплив таніну (1), лігносульфонату натрію (2), галлової кислоти (3) та перекису водню (4) на АОА міцелію штамів Р-ер *Pleurotus eryngii* (А), Fh-08 *Fistulina hepatica* (В) та 960 *Agrocybe cylindracea* (С)

Встановлено індивідуальну реакцію АОА культур на застосовану речовину і час її експозиції. Найвищий ступінь індукції АОА міцелію зафіксовано при додаванні: таніну – на 147%, через 48 годин експозиції, штаму Fh-08; лігносульфонату натрію – на 164%, 48 год., штаму 960; галлової кислоти – на 121%, 48 год., штаму 960; перекису водню – на 114%, 48 год.,

штаму Fh-08.

### Висновки до розділу 5

1. Визначення та порівняння загальної АОА міцелію дозволили виявити найпродуктивніші штами базидієвих грибів за рівнем цього показнику: P-er *P. eryngii*, > P-citr *P. citrinopileatus*, > P-035 *P. ostreatus*, > Fh-08 *F. hepatica* > 960 *A. cylindracea*.
2. Найвищі значення загальної АОА КФ зафіксовані для штамів: P-081 > P-082 > P-087 *P. ostreatus* > P-citr *P. citrinopileatus*.
3. Штами-продуценти природних антиоксидантів можуть бути використані в якості біологічних агентів у біотехнології функціональних продуктів чи профілактичних препаратів.
4. Виявлена можливість регуляції (індукція чи репресія) АОА ксилотрофів та встановлена певна концентрація в живильному середовищі таніну, лігносульфонату натрію, галової кислоти та пероксиду водню.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в 7 публікаціях – статтях у фахових виданнях [145, 156, 168, 255] та матеріалах конференцій [125, 159, 259].



## РОЗДІЛ 6.

### СТАН ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ШТАМІВ БАЗИДІЄВИХ ГРИБІВ

Прооксидантно-антиоксидантна система (ПАС) живого організму включає два взаємопротилежні процеси: генерацію активних форм кисню (АФК), що ініціюють вільнорадикальне перекисне окислення (ВРПО) та сповільнення чи припинення процесу окислення комплексом речовин антиоксидантного захисту (АОЗ) [266, 405].

Увага до зміни показників ПАС пояснюється їх вирішальним значенням в функціонуванні організму на клітинному та організменному рівнях. В численних дослідженнях, які проводяться в області вільнорадикальної біології, показано, що розвиток дисбалансу ПАС супроводжується порушенням функціонування систем організму [240]. Зокрема, зміщення рівноваги ПАС призводить до зниження його резистентності до несприятливих екзогенних та ендогенних факторів і є одним з ключових ланок розвитку патогенетичних явищ [129]. Окислювальний стрес, що супроводжується переважанням прооксидантного процесу над антиоксидантним, характеризується посиленням неконтрольованих реакцій вільнорадикального окислення (ВРО) в т.ч. ПОЛ з одночасним виснаженням антиоксидантної системи.

Кореляція окислювального стресу та розвитку патогенетичних явищ можлива посиленням біосинтезу власних чи внесенням додаткових про- і антиоксидантів [129].

Відомо, що довготривале використання штучних лікарських препаратів, в т.ч. антиоксидантів обмежене через їх потенційну токсичну дію. Це підвищує актуальність пошуку високопродуктивних природних продуцентів біологічно активних речовин [266].

Одними з перспективних організмів-продуцентів БАР профілактично-

лікувальної дії є базидієві гриби [129, 397]. Доведено, що ці організми як в природних умовах, так і за їх штучного вирощування здатні до синтезу та накопичення повноцінного протеїну і численних БАР. Приміром, їх складні ензимні комплекси прооксидантно-антиоксидантної системи задіяні в біотрансформації складних та хімічно стійких біополімерів, що має промислове [284, 405] і екологічне значення [175, 249, 258].

Як наслідок, інтенсивно розробляються способи культивування їстівних і лікарських видів базидіомікозових та виділення їх метаболітів [22, 50]. Це поліцукри і ензими, поліфеноли і терпени, полікетиди і стероїди, вітаміни і вітаміноподібні речовини, тощо [50]. Їх терапевтична дія, в першу чергу, обумовлена антиоксидантною активністю – здатністю до поглинання (*scavenging*) вільних радикалів, модуляції активності ензимів шляхом хелатування металів та пригнічення процесу окислення ліпідів [129, 192, 284]. Дослідження показали, що грибні метаболіти, в т.ч. антиоксиданти мають високий рівень біодоступності і здатні швидко метаболізуватися в організмі. Вживання грибів і інших продуктів з високою концентрацією антиоксидантів зумовлює появу в плазмі крові біоактивних метаболітів, що, в свою чергу, підвищує її антиоксидантну активність [129].

Виходячи з вищезазначеного, на цьому етапі роботи встановлювали та порівнювали показники стану прооксидантно-антиоксидантної системи штамів базидієвих грибів.

### **6.1. Прооксидантна активність**

Показники прооксидантної активності (ПОА) міцелію (рис. 6.1) та культурального фільтрату (рис. 6.2) досліджених штамів мають індивідуальні значення і характеризуються наступними позначками.

ПОА міцелію переважної більшості штамів на 9-ту та 12-ту добу культивування знаходиться в межах від  $0,15 \pm 0,1$  (штам F-610 *F. velutipes*, 9 ДК) до  $0,51 \pm 0,2$  (штам Dq-08 *D. quercina*, 12 ДК).

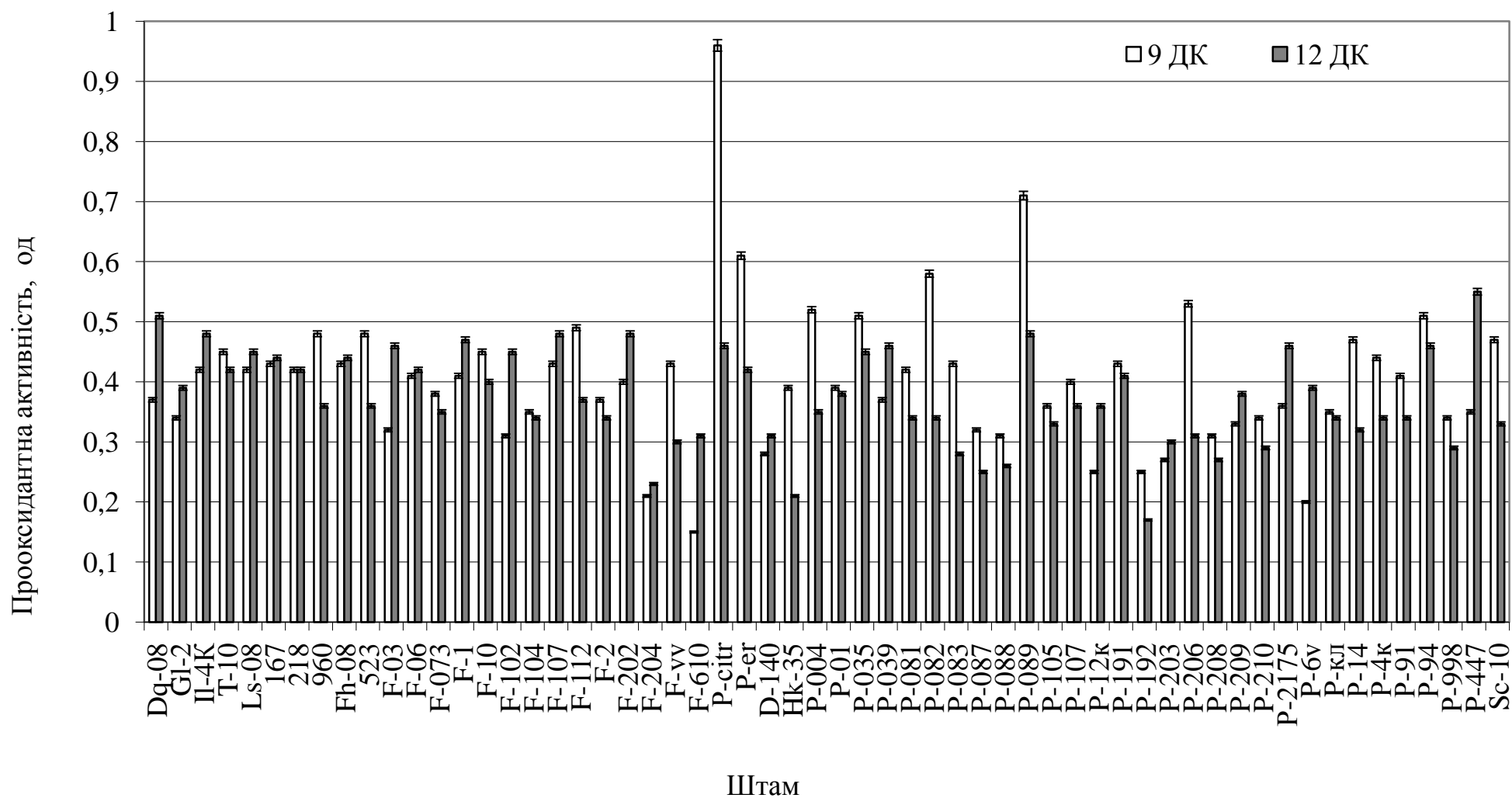


Рис. 6.1. Проксидантна активність міцелію штамів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування

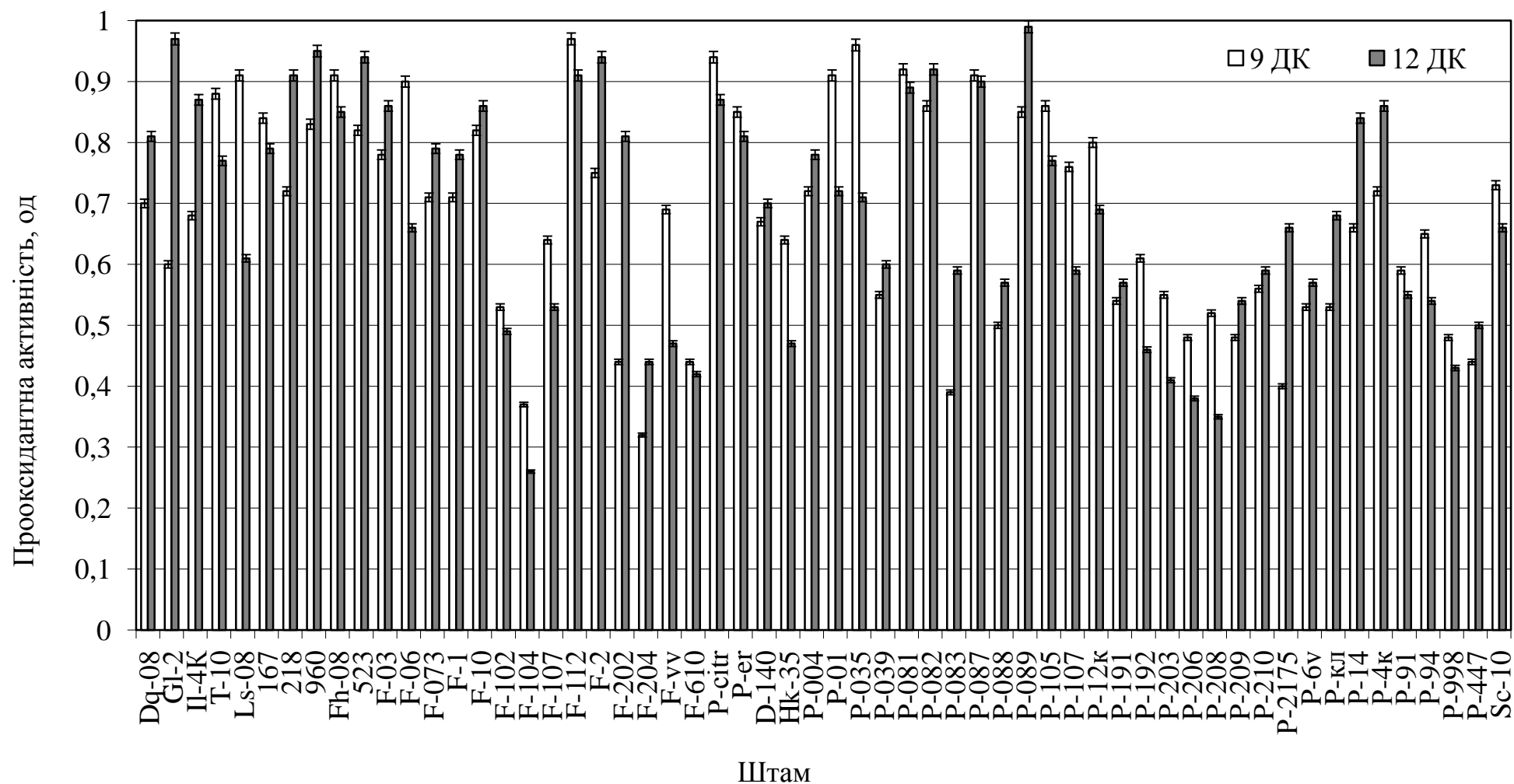


Рис. 6.2. Прооксидантна активність культурального фільтрату штамів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування

Виключенням тут є штами P-citr *P. citrinopileatus*, P-089 і P-082 *P. ostreatus*, P-er *P. eryngii*, активність прооксидантної складової ПАС міцелію на 9-ту добу культивування яких має найвищі значення  $0,96 \pm 0,2$ ;  $0,71 \pm 0,1$  і  $0,58 \pm 0,2$  та  $0,61 \pm 0,1$  відповідно. Цікаво, також, відмітити в цій групі штам P-447 *P. ostreatus*, ПОА міцелію якого на 12 ДК перевищує цей показник на 9 ДК і дорівнює  $0,55 \pm 0,2$ .

Активність прооксидантної складової прооксидантно-антиоксидантної системи в КФ вища за цей показник у міцелії. За найвищими значеннями на 12-ту добу культивування тут виділяються штами P-089 *P. ostreatus* і Gl-2 *G. lucidum*. Далі, в порядку убутання ПОА КФ йдуть штами F-107 *F. velutipes*, P-035 *P. ostreatus*, 960 *A. cylindracea* і ін. Найнижчі значення ПОА КФ зафіксовані на 12-ту добу культивування штаму F-104 *F. velutipes*.

За максимальними значеннями ПОА у 9-ти чи 12-ти добовому віці штами базидієвих грибів розподіляються на умовні групи (рис. 6.3).

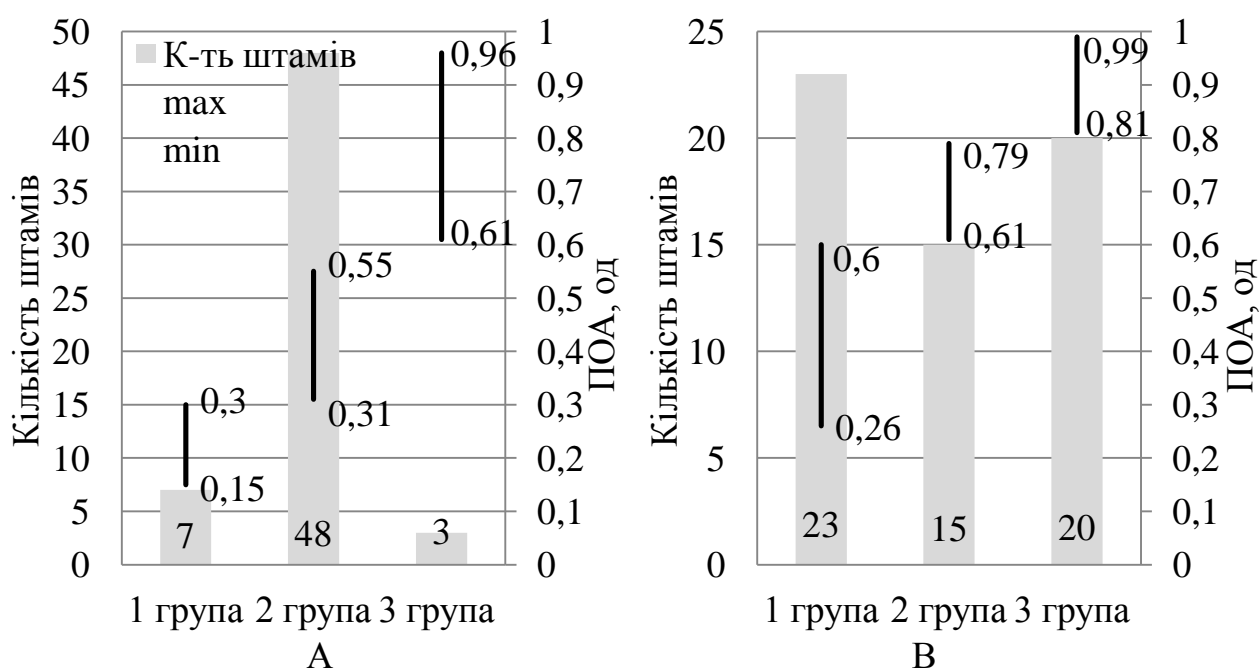


Рис. 6.3. Розподіл штамів базидієвих грибів за рівнем прооксидантної активності міцелію (А) та культурального фільтрату (В)

Узагальнюючи отримані експериментальні дані, треба відмітити, що

для всіх досліджених штамів базидієвих грибів характерне значне переважання активності прооксидантної складової ПАС в КФ порівняно з цим показником міцелію. Найвищі значення ПОА КФ відмічаються на 12-ту добу культивування штаму P-089 *P. ostreatus* і штаму Gl-2 *G. lucidum*, а міцелію – на 9-ту добу культивування штамів P-citr *P. citrinopileatus*, P-089 і P-082 *P. ostreatus*, P-er *P. eryngii*. Встановлено, що є пряма залежність між показниками ПОА КФ і міцелію кожного штаму, однак, ця залежність та рівень показника не відображають їх систематичного положення. Штами з високим рівнем ПОА, особливо в КФ, мають перспективи застосування в біотехнології, зокрема окисної біодеструкції хімічно стійких сполук і поліутантів.

## 6.2. Резерв субстратів перекисного окислення

Наступним етапом розраховували показник резерву субстратів перекисного окислення (СПО), до яких, переважно, входять ліпідні сполуки, зокрема, поліненасичені жирні кислоти. Його рівень вказує на можливість індукції процесу ПОЛ за умов дії різноманітних факторів і є однією з характеристик стану прооксидантно-антиоксидантної системи.

За рівнем СПО міцелію (рис. 6.4) і СПО КФ (рис. 6.5) на 12-ту добу культивування, досліджені штами умовно поділяються на групи (рис. 6.6).

Встановлено, що показник резерву СПО КФ значно нижчий цього показника міцелію. Штами з низькими значеннями показнику резерву СПО мають високу інтенсивність процесів ПОЛ із залученням більшості доступних субстратів. Для штамів з високими значеннями показнику резерву СПО характерна низька інтенсивність процесів ПОЛ із залученням незначної кількості доступних субстратів та, ймовірно, високим вмістом АО.

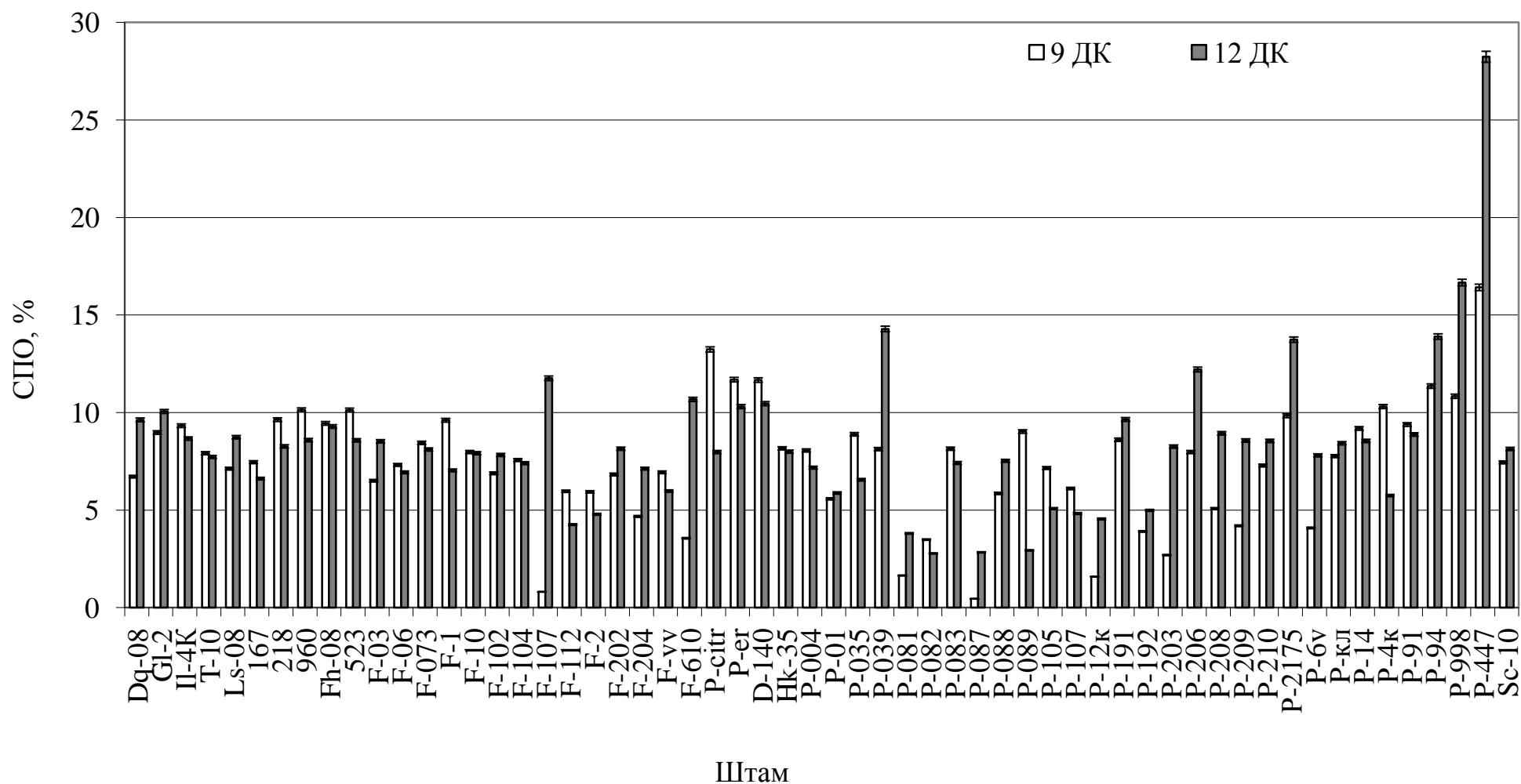


Рис. 6.4. Показник резерву субстратів перекисного окислення міцелію штамів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування

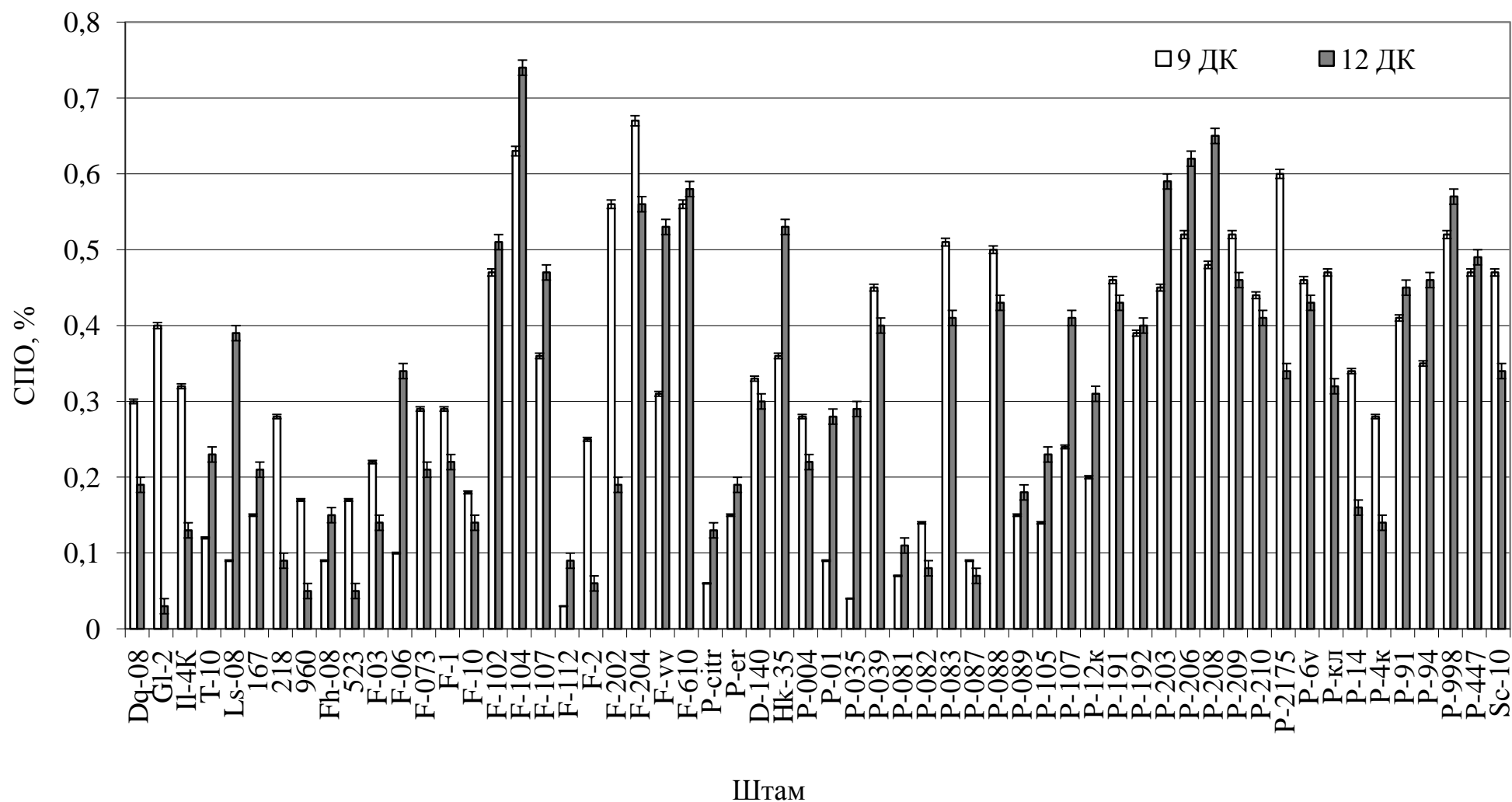


Рис. 6.5. Показник резерву субстратів перекисного окислення КФ штамів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування



Найвищі значення резерву СПО міцелію зафіксовані у штамів Р-447, Р-998, Р-039, Р-94, Р-2175 і D-140 *P. ostreatus*, Р-citr *P. citrinopileatus*, Р-er *P. eryngii* та F-107 і F-610 *F. velutipes*. До штамів з високими значеннями показнику резерву СПО КФ відносяться F-104, F-204, F-610, F-202 і F-vv *F. velutipes* та Р-208, Р-206, Р-2175, Р-203 і Р-998 *P. ostreatus*.

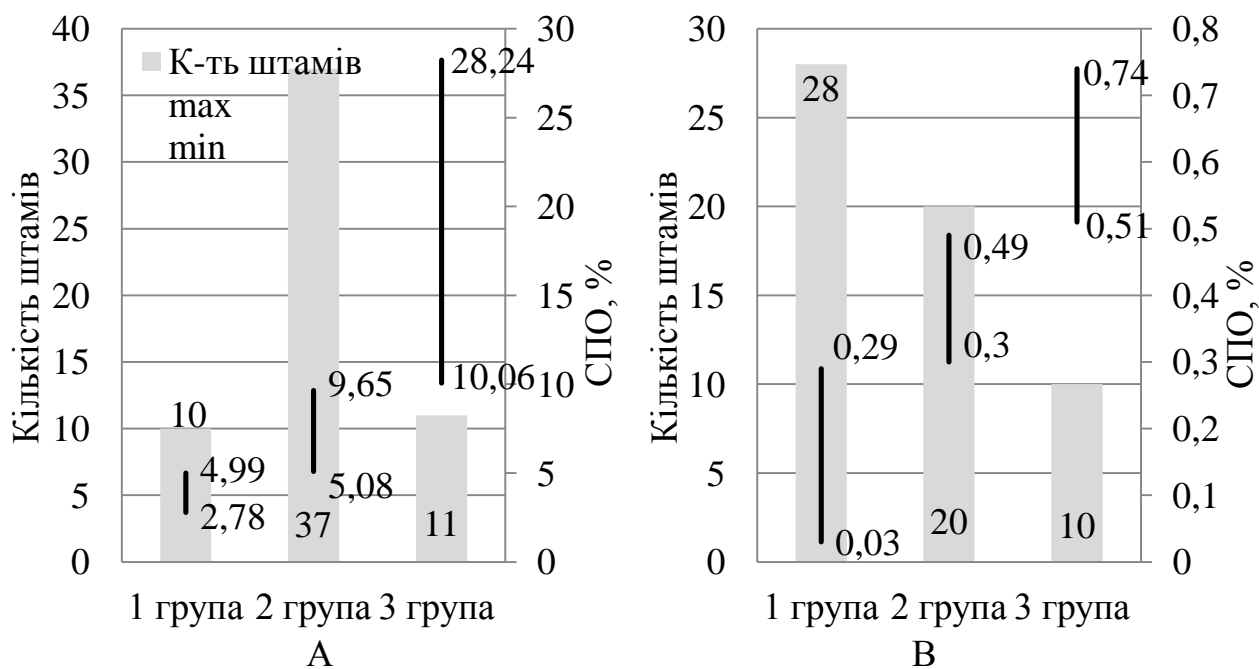


Рис. 6.6. Розподіл штамів базидієвих грибів за показником резерву субстратів перекисного окислення міцелію (А) та культурального фільтрату (В) на 12-ту добу культивування

Узагальнюючи отримані на цьому етапі роботи дані, зазначимо виявлену для переважної більшості штамів суттєву перевагу показників резерву субстратів перекисного окислення міцелію над таким показником КФ.

Найвищі значення резерву СПО міцелію зафіксовані для восьми штамів Р-447, Р-998, Р-039, Р-94, Р-2175, Р-citr, Р-er, D-140 роду *Pleurotus* та двох штамів F-107, F-610 роду *Flammulina*. Названі штами в силу встановлених характеристик перспективні для застосування у індикації певних біотехнологічних чи екологічних процесів.

### 6.3. Коефіцієнт рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи

Коефіцієнт рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи відображає співвідношення значень активності антиоксидантної та прооксидантної систем. При переважанні останньої – посиленні неконтрольованих реакцій вільнорадикального окислення, значення  $K_{\text{РПАС}}$  мають тенденцію до значного зниження. При зростанні активності захисних систем, в т.ч. антиоксидантної – показники  $K_{\text{РПАС}}$  зростають до порівняно високих значень.

Зіставлення коефіцієнтів рівноваги ПАС міцелію (рис. 6.7) і КФ (рис. 6.8) досліджених штамів базидієвих грибів дозволяє поділити їх на групи (рис. 6.9; рис. 6.10).

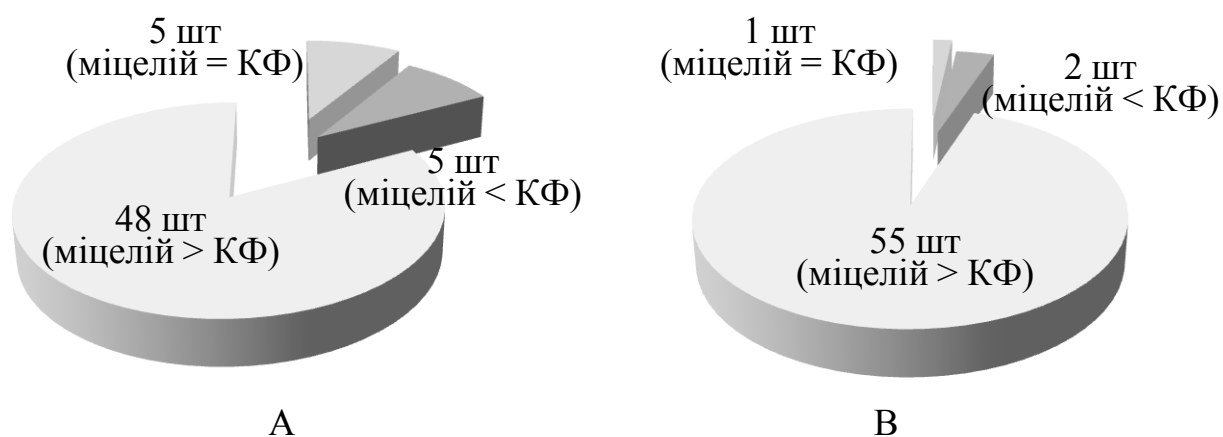


Рис. 6.9. Розподіл штамів базидієвих грибів за співвідношенням коефіцієнтів рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи міцелію і КФ штамів на 9-ту (А) та 12-ту (В) добу культивування

Так, на 9 ДК до першої групи входять п'ять штамів F-202 і F-204 *F. velutipes*, P-083, P-12к і P-206 *P. ostreatus* з однаковими в межах штаму значеннями  $K_{\text{РПАС}}$  міцелію і КФ. До другої – п'ять штамів P-081, P-082, P-087, P-203 і P-209 *P. ostreatus* з вірогідно вищими значеннями  $K_{\text{РПАС}}$  КФ.

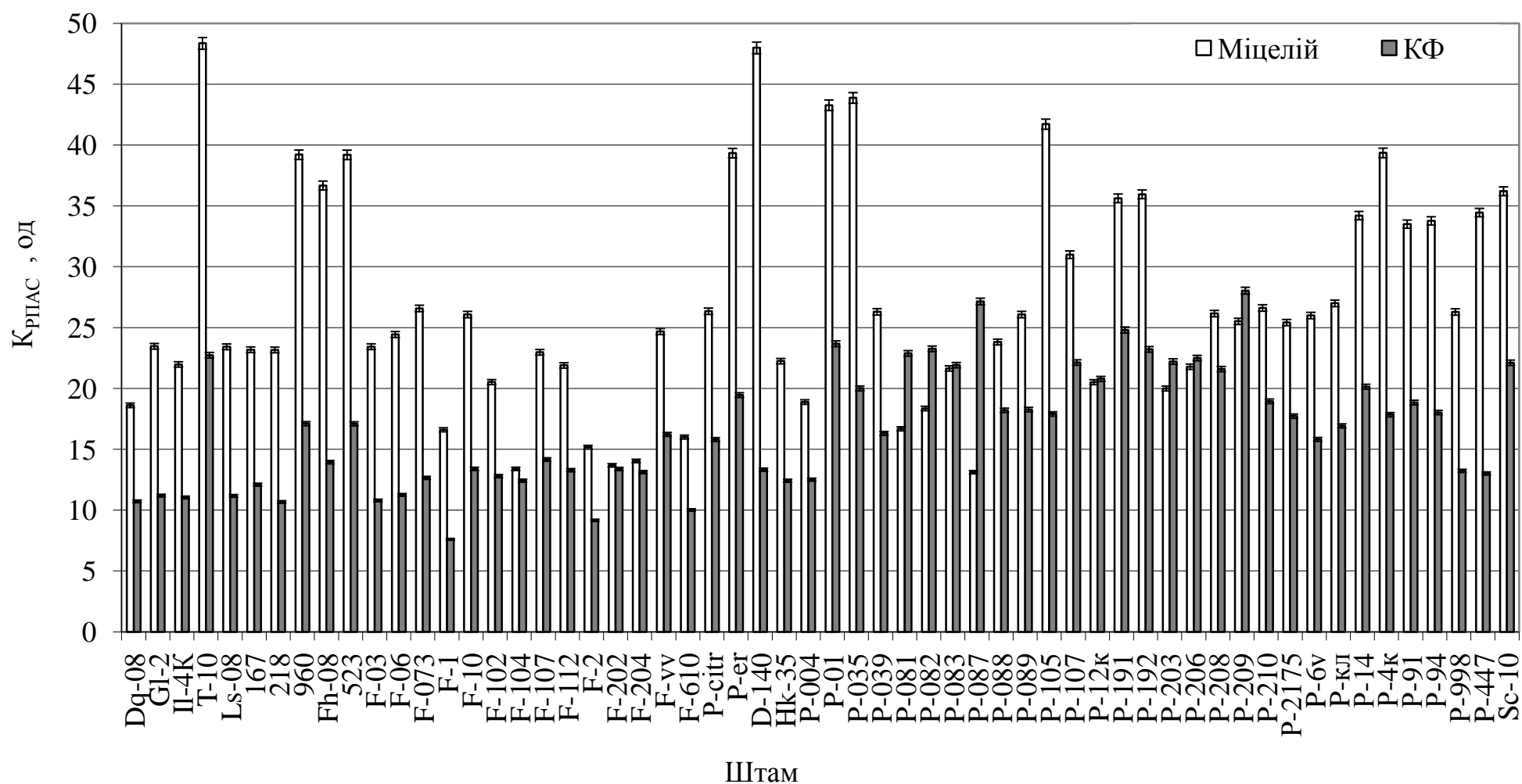


Рис. 6.7. Коефіцієнт рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи мицелію і КФ штамів на 9-ту добу культивування

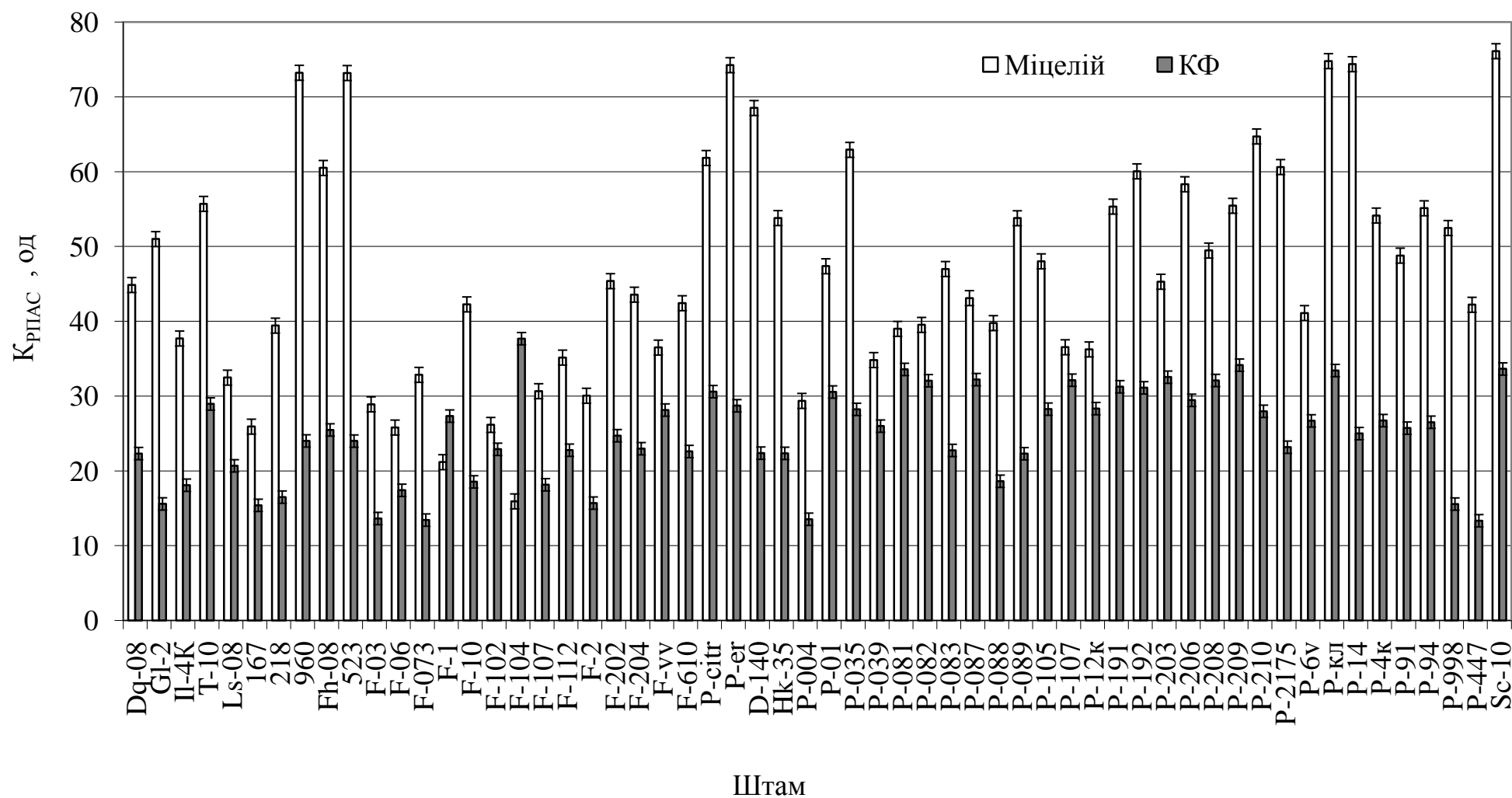


Рис. 6.8. Коефіцієнт рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи міцелію і КФ штамів на 12-ту добу культивування

Найбільша, третя група об'єднує сорок вісім штамів з вірогідно вищими значеннями  $K_{PAC}$  9-добового міцелію. Максимальні значення коефіцієнтів рівноваги ПАС міцелію в цій групі зафіксовані для п'яти штамів T-10 *F. fomentarius* та D-140, P-035, P-01 і P-105 *P. ostreatus*. Ці штами вирізняються високим рівнем АОО міцелію на 9-ту добу культивування і можуть бути рекомендовані як продуценти антиокисних речовин.

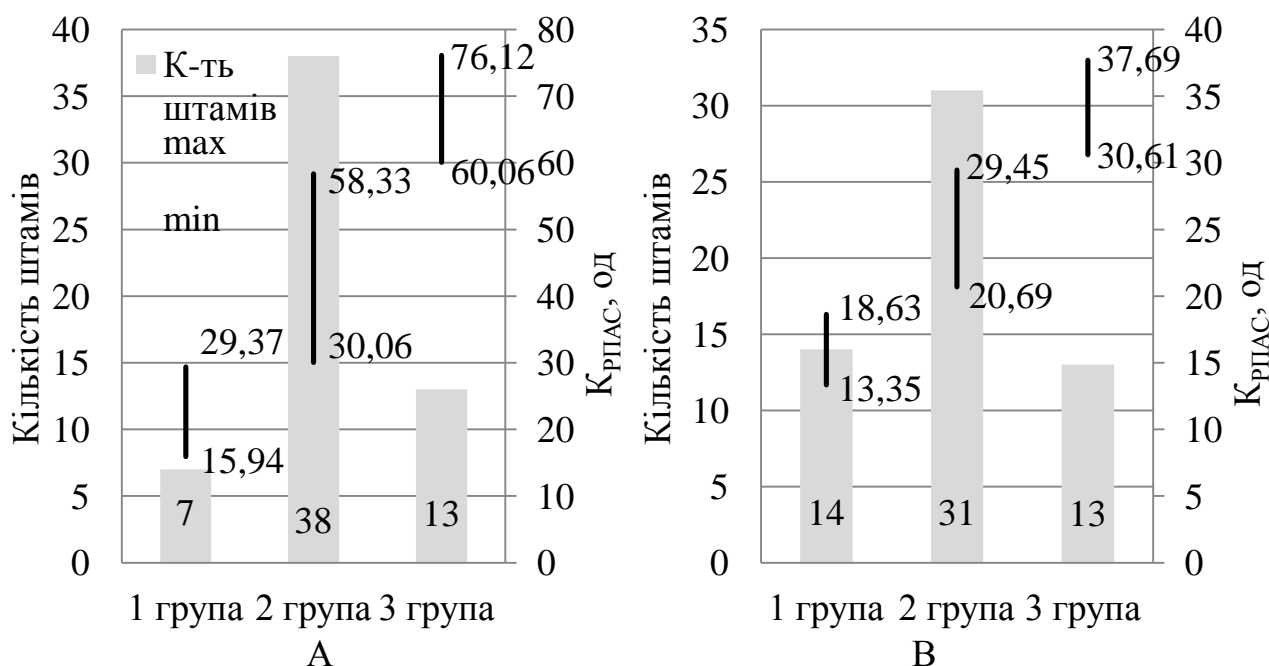


Рис. 6.10. Розподіл штамів базидієвих грибів за показником коефіцієнту рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи міцелію (А) і КФ (В) на 12-ту добу культивування

Подовження терміну культивування до 12-ти діб підтверджує виявлену для переважної більшості штамів тенденцію до переважання значень коефіцієнтів рівноваги ПАС міцелію над такими КФ. З цієї групи треба відзначити п'ять штамів – Sc-10 *S. commune*, P-кл і P-14 *P. ostreatus*, P-er *P. eryngii* та 960 *A. cylindracea*. Названі штами вирізняються найвищими серед зафіксованих значеннями  $K_{PAC}$  12-ти добового міцелію. Вони доповнюють групу штамів з високим рівнем АОО міцелію на 9-ту добу

культивування і також можуть бути рекомендовані як продуценти антиокисних речовин. Треба відмітити (рис. 6.9), що групи з однаковими та переважаючими у КФ значеннями  $K_{\text{ПАС}}$  на 12-ту добу культивування зменшились до одного штаму F-102 та двох – F-1 і F-104 *F. velutipes*, відповідно.

### Висновки до розділу 6

1. Для досліджених штамів базидієвих грибів характерне значне переважання активності прооксидантної складової ПАС в КФ порівняно з цим показником міцелію.
2. Найвищі значення прооксидантної активності КФ відмічаються на 12-ту добу культивування штаму P-089 *P. ostreatus* і штаму Gl-2 *G. lucidum*, а міцелію – на 9-ту добу культивування штамів P-citr *P. citrinopileatus*, P-er *P. eryngii*, P-089 і P-082 *P. ostreatus*.
3. Є пряма залежність між показниками ПОА КФ і міцелію кожного штаму, ця залежність та рівень показника не відображають їх систематичного положення.
4. Виявлена суттєва перевага показників резерву СПО міцелію більшості штамів над таким показником КФ. Найвищі значення резерву СПО міцелію зафіксовані для штамів P-447, P-998, P-039, P-94, P-2175 і D-140 *P. ostreatus*, P-citr *P. citrinopileatus*, P-er *P. eryngii* та штамів F-107 і F-610 *F. velutipes*.
5. Для абсолютної більшості штамів характерне переважання значень коефіцієнтів рівноваги ПАС міцелію над такими КФ. Максимальні значення коефіцієнтів рівноваги ПАС 9-ти добового міцелію зафіксовані для штамів T-10 *F. fomentarius* і D-140, P-035, P-01, P-105 *P. ostreatus* та 12-ти добового – штамів Sc-10 *S. commune*, P-кл, P-14 *P. ostreatus*, P-er *P. eryngii*, 960 *A. cylindracea* і 523 *L. edodes*. Названі штами вирізняються високим рівнем АОА міцелію на встановлену

добу культивування і можуть бути рекомендовані як продуценти антиоксидантів грибного походження.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в 5 публікаціях – статтях у фахових виданнях [156, 160, 168, 175] та матеріалах конференції [159].

## РОЗДІЛ 7.

### ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА БАЗИДІЄВИХ ГРИБІВ – ПРОДУЦЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНИХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ

У антиоксидантному захисті клітин одну з визначальних ролей відіграють антиоксидантні ферменти – каталази, пероксидази, супероксиддисмутаза тощо. У ряді робіт [11, 17, 63, 180] звертається увага на зв'язок між АОА, умовами культивування та біосинтезом і активністю цих ферментів. Виходячи з цього, вивчали оксидоредуктазну активність грибних культур.

#### 7.1. Каталази

##### 7.1.1. Каталазна активність штамів базидієвих грибів

Каталаза (КФ 1.11.1.6) є одним із головних компонентів комплексного ферментативного захисту клітин за умов окислювального стресу. Основна її функція – розщеплення пероксиду водню на воду та молекулярний кисень, а також участь у ряді окислювально-відновлювальних реакціях за участі різноманітних субстратів [50, 59].

У зв'язку з високою каталітичною активністю та мультифункціональністю, каталаза знайшла широке застосування в різних галузях промисловості, сільського господарства та медицині. Зокрема, вона використовується в процесах деградації залишкових кількостей пероксиду водню в технологіях легкої, хімічної та харчової промисловості [50, 103, 185]. Цей ензим є компонентом біосенсорів для кількісного визначення вмісту пероксиду водню й етанолу [87, 109] та застосовується для створення поліферментних антиоксидантних препаратів. Він задіяний в клінічній діагностиці в складі диференційно-діагностичних поживних середовищ для виявлення та обліку патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів [50, 178].



Вперше виділено та досліджено властивості промислового ферментного препарату каталази з клітин печінки тварин, який за походженням є достатньо коштовний. Розроблено методи виділення каталази з мікроміцетів родів *Penicillium* та *Aspergillus*. Однак, ці цвілеві гриби мають обмежене використання в біотехнології, оскільки синтезують вторинні метаболіти – мікотоксини – потенційно небезпечні та токсичні сполуки.

Отже, фермент каталаза є широко затребуваний, що зумовило активний пошук його продуцентів серед різних груп організмів [50-49].

Останнім часом в біотехнології сформувався новий напрямок – фармацевтична мікологія – наука, що вивчає шляхи практичного використання грибів [239]. Ці організми здатні до рясного росту і синтезу численних біологічно активних речовин на відносно дешевих живильних середовищах в умовах поверхневого і глибинного культивування. При цьому, вони не дають спороношення на стадії вегетативного росту, що знижує небезпеку професійних захворювань людей в біотехнологічному виробництві. Отримання грибних екзометаболітів не вимагає значних витрат, які за низкою властивостей (оптимум рН і температури дії) більш близькі до тваринних [239].

Через те, метою цього етапу роботи було встановлення та порівняння каталазної активності базидієвих грибів та відбір активних штамів – продуцентів цього ферменту.

Питома каталазна активність міцелію (рис. 7.1) та культурального фільтрату (рис. 7.2) досліджуваних штамів має наступні характеристики.

Для більшості штамів властива позитивна кореляція реєстрованих показників: найвищий рівень  $KA_{\text{ПТ}}$  як у міцелії, так і в КФ відповідає 12-тій добі культивування.

Виключенням тут є  $KA_{\text{ПТ}}$  міцелію восьми штамів: Т-10 *F. fomentarius*, Р-004, Р-01, Р-035, Р-082, Р-107 і Р-447 *P. ostreatus* та Sc-10 *S. commune* та  $KA_{\text{ПТ}}$  КФ чотирьох штамів Нк-35, Р-004, Р-035 і Р-082 *P. ostreatus* ферментативна активність яких знижується наприкінці терміну

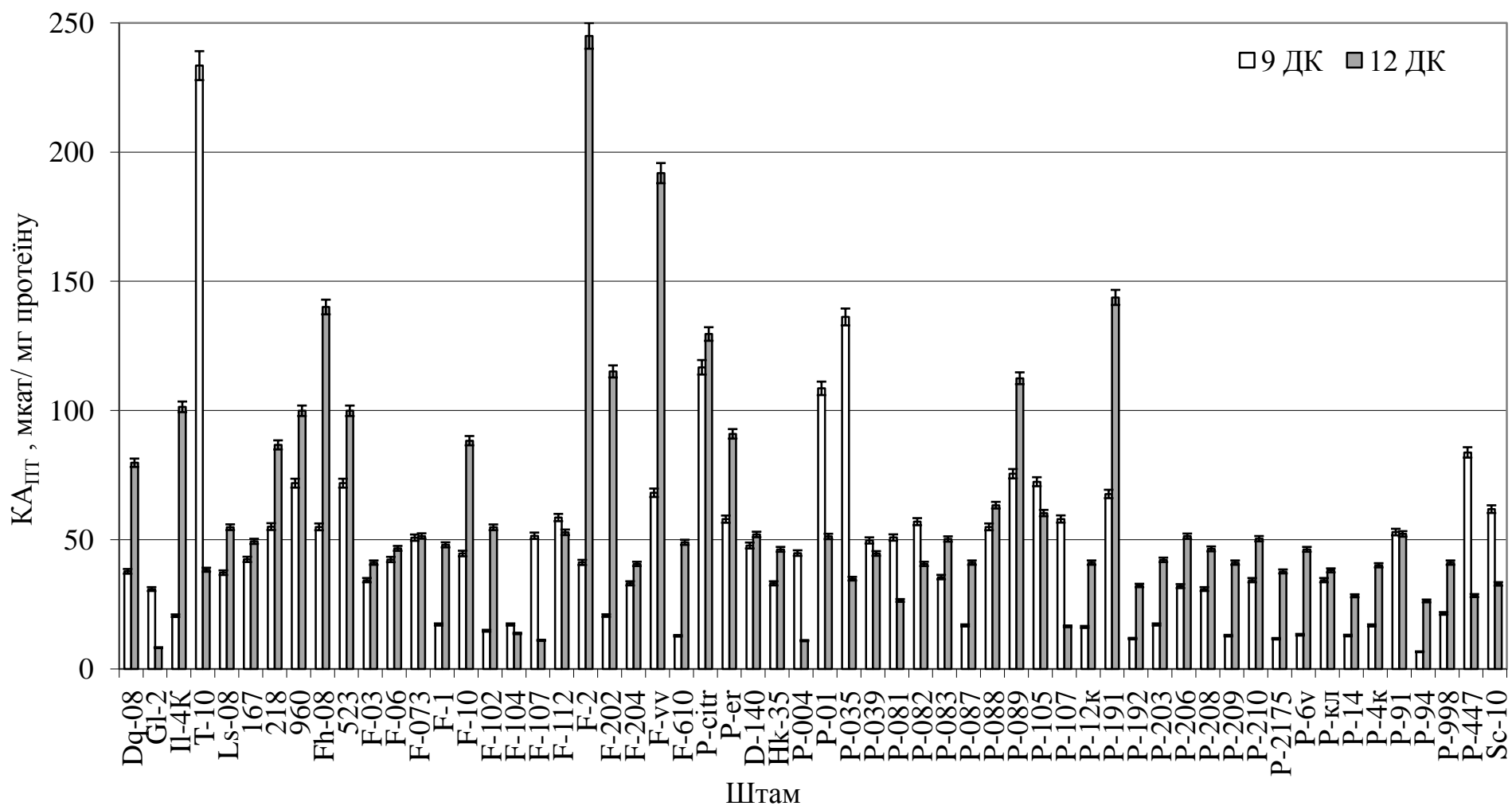


Рис. 7.1. Питома каталазна активність міцелію штамів базидієвих грибів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування

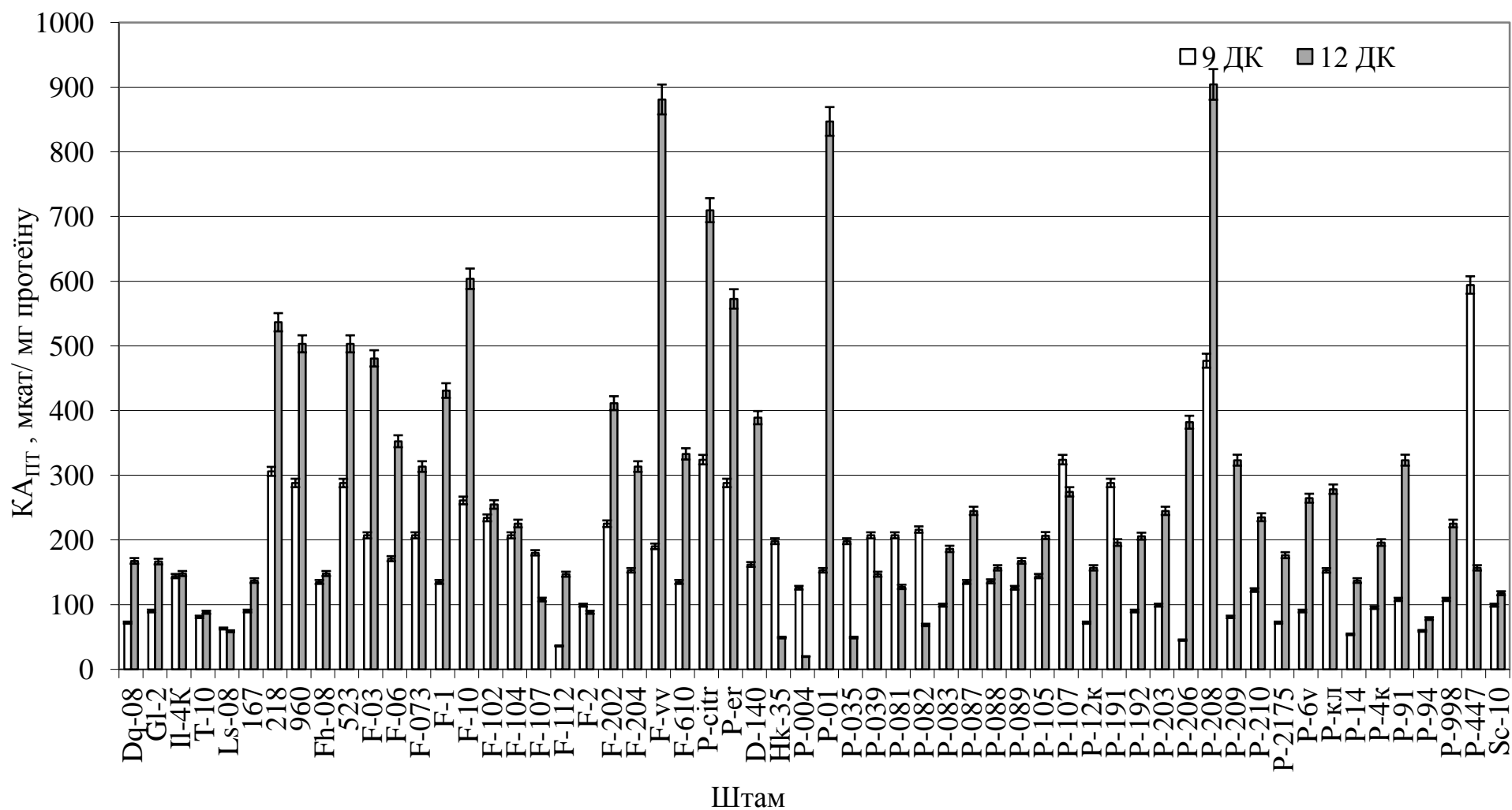


Рис. 7.2. Питова каталазна активність культурального фільтрату штамів базидієвих грибів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування

культивування. Це, скоріш за все, пояснюється субстратною регуляцією активності ферменту та індивідуальними характеристиками самих штамів.

За рівнем каталазної активності міцелію, досліджувані штами розподіляються на три групи.

До першої, з високими значеннями  $KA_{\text{ПТ}}$  міцелію – понад 150 мкат/мг, відносяться три штами: T-10 *F. fomentarius*, F-2 і F-vv *F. velutipes*.

До другої групи з середньою  $KA_{\text{ПТ}}$  міцелію – від 100 до 150 мкат/мг, входять шість штамів: Fh-08 *F. hepatica*, P-191, P-089, P-01 *P. ostreatus*, P-citr *P. citrinopileatus*, F-202 *F. velutipes*.

Третя група з низьким рівнем  $KA_{\text{ПТ}}$  міцелію – до 100 мкат/мг, найбільша і складається з сорока восьми або 84% штамів. Виходячи з отриманих результатів, ці культури не можуть розглядатися як перспективні продуценти міцеліальної каталази.

За даними дослідження, штами базидієвих грибів активно синтезують (виділяють) позаклітинну каталазу, що підтверджується більш високим рівнем її активності у КФ в порівнянні з міцелієм. Ймовірно, це пояснюється тим, що в природі синтез екстрацелюлярної каталази дереворуйнівними базидіомікотовими, зумовлений генетично та індукується субстратом чи окремими його компонентами.

За рівнем каталазної активності міцелію, досліджувані штами розподіляються на три групи.

До першої, з найвищими значеннями  $KA_{\text{ПТ}}$  КФ – понад 600 мкат/мг, відносяться чотири штами: P-208 і P-01 *P. ostreatus*, F-vv *F. velutipes*, P-citr *P. citrinopileatus*.

До другої групи з середньою  $KA_{\text{ПТ}}$  КФ – від 300 до 600 мкат/мг, входять п'ятнадцять штамів: 218, 960 *A. cylindracea*, 523 *L. edodes*, F-03, F-06, F-1, F-10, F-202 і F-610 *F. velutipes*, P-er *P. eryngii*, D-140, P-206, P-209, P-91, P-447 (9ДК) *P. ostreatus*.

До третьої групи з низьким рівнем  $KA_{\text{ПТ}}$  КФ – до 300 мкат/мг входить двадцять дев'ять або 51% штамів, які не розглядалися нами в якості

перспективних продуцентів екстрацелюлярної каталази.

Для порівняння отриманих даних, зазначимо, що загальна КА сироватки крові тварин – одного з джерел промислового отримання ферменту каталази складає від 16,8 до 166,6 мкат/ дм<sup>3</sup>.

Таким чином, проведені дослідження дозволили встановити рівень каталазної активності та відібрати перспективні штами Т-10 *F. fomentarius*, F-2 і F-vv *F. velutipes* для біосинтезу міцеліальної та Р-208 і Р-01 *P. ostreatus*, F-vv *F. velutipes*, Р-citr *P. citrinopileatus* – екстрацелюлярної каталази.

### **7.1.2. Оптимізація живильного середовища для культивування штамів-продуцентів каталаз**

Відомо, що гриби здатні засвоювати різноманітні цукри, такі як пентози, галактози, полісахариди типу геміцелюлоз, крохмаль, інουλін та інші. Втім, їх поглинання штамами йде з різною швидкістю, одні вуглецеві сполуки включаються в метаболічні процеси більш ефективно порівняно з іншими. Як наслідок, в залежності від типу джерела вуглецевого живлення базидієві гриби мають різну динаміку ферментативної активності, накопичення біомаси, рН культурального фільтрату тощо. Рівень живлення і співвідношення його компонентів в субстраті, особливо джерел вуглецю і азоту може різко змінювати біосинтетичну функцію цих організмів [18, 95].

Виходячи з вищезазначеного, було проведено дослідження впливу десяти сполук – джерел вуглецевого живлення на ріст та каталазну активність штамів Р-01 *P. ostreatus* (табл. 7.1) та F-vv *F. velutipes* (табл. 7.3).

Дослідні штами культивували за стандартних умов на ГПС. Вуглецьвмісні сполуки вносили в модифікації ГПС в кількості, перерахованій на вміст вуглецю у глюкозі.

Штам Р-01 *P. ostreatus*. Експериментальні дані впливу вуглецьвмісних сполук на ріст і КА штаму Р-01 *P. ostreatus* та їх статистичний аналіз свідчать про наступне.

Таблиця 7.1

**Вплив джерел вуглецевого живлення на ріст і каталазну активність  
штаму P-01 *Pleurotus ostreatus***

Вуглецевмісні сполуки	Вік культури, доба			
	9 (9 ДК)		12 (12 ДК)	
	АСБ, г/ дм <sup>3</sup>	КА <sub>ПТ</sub> КФ, мкат/мг	АСБ, г/ дм <sup>3</sup>	КА <sub>ПТ</sub> КФ, мкат/мг
1	2	3	4	5
Моносахариди (пентози)				
L-(+)-арабіноза	0,98 ± 0,01 *	158,40 ± 2,67 *	6,21 ± 0,11 *	506,88 ± 4,24 *
D-(+)-ксилоза	1,79 ± 0,06 *	97,39 ± 8,88 *	2,59 ± 0,06 *	468,00 ± 1,32 *
Моносахариди (гексози)				
DL-глюкоза (контроль)	2,69 ± 0,05	145,28 ± 1,29	3,88 ± 0,02	842,12 ± 7,24
L-(+)-рамноза	0,11 ± 0,02 *	78,34 ± 4,67 *	3,31 ± 0,06 *	411,18 ± 8,92 *
D-(+)-манноза	1,19 ± 0,01 *	49,63 ± 1,16 *	3,19 ± 0,01 *	370,30 ± 6,70 *
Олігосахариди (дисахариди)				
D-(+)-лактоза	1,04 ± 0,02 *	164,05 ± 1,93 *	2,81 ± 0,01 *	494,55 ± 3,59 *

Продовж. табл. 7.1

1	2	3	4	
DL-сахароза	$6,21 \pm 0,04 *$	$134,71 \pm 1,15 *$	$7,23 \pm 0,01 *$	$486,60 \pm 5,56 *$
Олігосахариди (трисахариди)				
DL-рафіноза	$1,85 \pm 0,01 *$	$160,06 \pm 3,27 *$	$1,69 \pm 0,12 *$	$445,10 \pm 8,97 *$
Полісахариди				
Крохмаль	$4,41 \pm 0,09 *$	$93,51 \pm 7,34 *$	$6,40 \pm 0,04 *$	$415,95 \pm 5,39 *$
Целюлоза	$1,99 \pm 0,03 *$	$169,17 \pm 2,47 *$	$3,15 \pm 0,01 *$	$470,08 \pm 3,22 *$

Примітка. «\*» – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Застосовані вуглецевмісні сполуки мають різний вплив на реєстровані показники росту та біосинтетичної активності цього штаму.

На 9-ту добу культивування штаму P-01 *P. ostreatus* максимальне накопичення АСБ зафіксовано на середовищі, що включало як джерело вуглецю сахарозу. За порядком зниження ростового показника на 9ДК, вуглецевмісні компоненти середовища розмістилися наступним чином: крохмаль, глюкоза, целюлоза, рафіноза, ксилоза, манноза, лактоза, арабіноза та рамноза. З часом, на 12 ДК, цей порядок вуглецевмісних сполук змінюється на: сахароза, крохмаль, арабіноза, глюкоза, рамноза, маноза, целюлоза, лактоза, ксилоза та рафіноза.

За впливом на ферментативну активність штаму P-01 *P. ostreatus*, джерела вуглецю вірогідно відрізняються від впливу на накопичення АСБ. У всіх варіантах досліджу каталазна активність КФ значно вища наприкінці експоненціального росту культур. Так, на 12-ту добу культивування, максимальна каталазна активність КФ штаму P-01 зафіксована на середовищі, що містило глюкозу. Далі, за позитивним впливом на КА<sub>ПТ</sub> КФ, цукристі речовини розташувалися у порядку: арабіноза, лактоза, сахароза, целюлоза, ксилоза, рафіноза, крохмаль, рамноза та манноза.

Таким чином, встановлено вплив джерел вуглецевого живлення на ріст і каталазну активність штаму P-01 *P. ostreatus* та залежність його від часу культивування. Кращими вуглецевмісними компонентами живильного середовища для отримання біомаси штаму P-01 є сахароза, крохмаль, арабіноза і глюкоза; для підвищення каталазної активності КФ – глюкоза, арабіноза, лактоза і сахароза.

Отримані дані були використані для розробки складу живильного середовища (удосконалення ГПС) для культивування штаму P-01 – продуценту каталази.

Удосконалення вихідного середовища, згідно поставленої задачі, проводили за методом повного факторного експерименту (ПФЕ-2<sup>4</sup>) [2, 98]. Варіювання ( $\lambda$ ) вмісту у живильних середовищах глюкози і пептону –



факторів  $x_1$ ,  $x_2$  складало 2 г/ дм<sup>3</sup>, а сірчаноокислого магнію і хлористого кальцію – факторів  $x_3$  і  $x_4$  – 0,2 г/ дм<sup>3</sup>, інші компоненти мали постійну концентрацію (табл. 5.5.). Штам P-01 *P. ostreatus* культивували на 17 модифікаціях ГПС упродовж 12 діб в стандартних умовах (табл. 7.2).

Встановлено, що найбільше накопичення біомаси штамом P-01 *P. ostreatus* спостерігається при культивуванні на живильному середовищі № 12, а також на середовищах № 3, 7, 8 в порядку убутання показника АСБ. Середовище № 12 мало максимальний вміст глюкози, пептону і  $K_2HPO_4$ . Для міцеліальних культур штаму P-01, що росли на середовищі № 13, де вміст глюкози і пептону були мінімальними, а вміст  $KH_2PO_4$  і  $K_2HPO_4$  – максимальним, зареєстровано мінімальне накопичення біомаси.

Отже, живильне середовище № 12 наступного складу, г/ дм<sup>3</sup>: глюкоза – 12; пептон – 5;  $KH_2PO_4$  – 0,4;  $K_2HPO_4$  – 0,6;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5;  $CaCl_2$  – 0,05;  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  – 0,001; дистильована вода до 1 дм<sup>3</sup> є найбільш придатним, з досліджених, для росту штаму P-01 *P. ostreatus*.

Разом з ростовими показниками, реєстрували і вплив факторів – співвідношення компонентів живильного середовища на КА штаму P-01. Так, найбільша  $КА_{ПТ}$  КФ штаму P-01 зафіксована при культивуванні на живильному середовищі № 6, а також на середовищах № 10 і 14 в порядку убутання активності ензиму.

Отже, живильне середовище № 6 з максимальним вмістом глюкози і  $KH_2PO_4$ , г/ дм<sup>3</sup>: глюкоза – 12; пептон – 1;  $KH_2PO_4$  – 0,8;  $K_2HPO_4$  – 0,2;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5;  $CaCl_2$  – 0,05;  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  – 0,001; дистильована вода – до 1 дм<sup>3</sup> є найбільш придатним для біосинтезу каталази штамом P-01 *P. ostreatus*.

Штам F-vv *F. velutipes*. Експериментальні дані щодо впливу вуглецевмісних сполук на ріст і КА штаму F-vv *F. velutipes* та їх статистичний аналіз свідчать про наступне (табл. 7.3).

Застосовані вуглецевмісні сполуки мають неоднаковий вплив на реєстровані показники росту та біосинтетичної активності цього штаму зимового опенька.

Таблиця 7.2

**Матриця планування складу ГПС та результати росту і каталазної активності штаму P-01 *Pleurotus ostreatus***

№ живильного середовища	Фактори					АСБ, г/ дм <sup>3</sup>	КА <sub>ПТ</sub> КФ, мкат/мг
	x <sub>1</sub> (глюкоза)	x <sub>2</sub> (пептон)	x <sub>3</sub> (КН <sub>2</sub> РО)	x <sub>4</sub> (К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> )	Взаємодія факторів		
	Вміст у живильному середовищі, г/ дм <sup>3</sup>						
1	2	3	4	5	6	7	8
1	8	1	0,4	0,2	1	3,28 ± 0,05 *	457,34 ± 4,65 *
2	12	1	0,4	0,2	x <sub>1</sub>	3,60 ± 0,08 *	851,19 ± 3,69
3	8	5	0,4	0,2	x <sub>2</sub>	4,90 ± 0,85 *	668,66 ± 1,98 *
4	12	5	0,4	0,2	x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	4,49 ± 0,08 *	752,74 ± 6,03 *
5	8	1	0,8	0,2	x <sub>3</sub>	3,37 ± 0,09 *	550,00 ± 1,55 *
6	12	1	0,8	0,2	x <sub>1</sub> x <sub>3</sub>	3,54 ± 0,02 *	1079,58 ± 6,32 *
7	8	5	0,8	0,2	x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	4,77 ± 0,06 *	748,84 ± 1,76 *
8	12	5	0,8	0,2	x <sub>1</sub> x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	4,73 ± 0,02 *	770,03 ± 1,32 *
9	8	1	0,4	0,6	x <sub>4</sub>	3,76 ± 0,02 *	851,42 ± 6,61
10	12	1	0,4	0,6	x <sub>1</sub> x <sub>4</sub>	3,93 ± 0,05	933,38 ± 5,85 *

Продовж. табл. 7.2

1	2	3	4	5	6	7	8
11	8	5	0,4	0,6	$x_2x_4$	$4,63 \pm 0,04 *$	$683,96 \pm 1,37 *$
12	12	5	0,4	0,6	$x_1x_2x_4$	$5,64 \pm 0,72 *$	$755,72 \pm 1,76 *$
13	8	1	0,8	0,6	$x_3x_4$	$3,27 \pm 0,06 *$	$507,86 \pm 1,60 *$
14	12	1	0,8	0,6	$x_1x_3x_4$	$3,59 \pm 0,05 *$	$891,18 \pm 4,23 *$
15	8	5	0,8	0,6	$x_2x_3x_4$	$4,50 \pm 0,01 *$	$670,10 \pm 2,91 *$
16	12	5	0,8	0,6	$x_1x_2x_3x_4$	$4,08 \pm 0,05 *$	$731,00 \pm 1,61 *$
17 (контроль)	10	3	0,6	0,4	0	$3,90 \pm 0,21$	$842,22 \pm 1,03$

Примітка. «\*» – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Як на 9-ту, так і на 12-ту добу культивування штаму F-vv *F. velutipes* максимальне накопичення АСБ зафіксовано на середовищі, що включало як джерело вуглецю сахарозу. Далі, за порядком зниження ростового показника, вуглецевмісні компоненти середовища розмістилися наступним чином: глюкоза, ксилоза, крохмаль, рафіноза, рамноза, арабіноза, целюлоза, лактоза та манноза.

За впливом на ферментативну активність штаму F-vv *F. velutipes*, джерела вуглецю вірогідно відрізняються від впливу на накопичення АСБ. У всіх варіантах досліду каталазна активність КФ значно вища наприкінці експоненціального росту культур. Так, на 12-ту добу культивування, максимальна каталазна активність КФ штаму F-vv зафіксована на середовищі, що містило глюкозу. Далі, за позитивним впливом на КА<sub>ПТ</sub> КФ, цукристі речовини розташувалися у порядку: крохмаль, сахароза, ксилоза, лактоза, арабіноза, целюлоза, рамноза, рафіноза та манноза.

Таким чином, встановлено вплив джерел вуглецевого живлення на ріст і каталазну активність штаму F-vv *F. velutipes* та залежність його від часу культивування. Кращими вуглецевмісними компонентами живильного середовища для отримання біомаси штаму F-vv є сахароза, глюкоза, ксилоза, крохмаль і рафіноза; для підвищення каталазної активності КФ – глюкоза, крохмаль, сахароза, ксилоза і лактоза.

Отримані дані були використані для удосконалення складу ГПС для культивування штаму F-vv *F. velutipes* – продуценту каталази.

Досліди проводили за методом повного факторного експерименту (ПФЕ-2<sup>4</sup>). Штам F-vv культивували на 17 модифікаціях ГПС упродовж 12 діб в стандартних умовах (табл. 7.4).

Встановлено, що найбільше накопичення біомаси штамом F-vv *F. velutipes* спостерігається при культивуванні на живильному середовищі № 12, а також на середовищах № 16, 8, 4 в порядку убуття показника накопичення АСБ.

Таблиця 7.3

**Вплив джерел вуглецевого живлення на ріст і каталазну активність  
штаму F-vv *Flammulina velutipes***

Вуглецевмісні сполуки	Вік культури, доба			
	9 (9 ДК)		12 (12 ДК)	
	АСБ, г/ дм <sup>3</sup>	КА <sub>ПТ</sub> КФ, мкат/мг	АСБ, г/ дм <sup>3</sup>	КА <sub>ПТ</sub> КФ, мкат/мг
1	2	3	4	5
Моносахариди (пентози)				
L-(+)-арабіноза	1,00 ± 0,02 *	158,40 ± 2,67	1,21 ± 0,10 *	311,05 ± 8,50 *
D-(+)-ксилоза	1,61 ± 0,09 *	97,39 ± 8,88 *	2,88 ± 0,11 *	495,00 ± 6,00 *
Моносахариди (гексози)				
DL-глюкоза (контроль)	1,95 ± 0,05	145,28 ± 1,29	3,37 ± 0,03	840,05 ± 10,05
L-(+)-рамноза	1,31 ± 0,02 *	78,34 ± 4,67 *	1,36 ± 0,06 *	211,00 ± 5,95 *
D-(+)-манноза	0,24 ± 0,01 *	49,63 ± 1,16 *	0,50 ± 0,01 *	178,00 ± 5,30 *
Олігосахариди (дисахариди)				
D-(+)-лактоза	0,64 ± 0,02 *	164,05 ± 1,93	0,91 ± 0,01 *	360,10 ± 10,59 *

Продовж. табл. 7.3

1	2	3	4	
DL-сахароза	$3,45 \pm 0,05 *$	$134,71 \pm 1,15 *$	$4,23 \pm 0,02 *$	$660,60 \pm 10,03 *$
Олігосахариди (трисахариди)				
DL-рафіноза	$1,35 \pm 0,02 *$	$160,06 \pm 3,27$	$2,39 \pm 0,10 *$	$200,10 \pm 8,03 *$
Полісахариди				
Крохмаль	$1,41 \pm 0,01 *$	$93,51 \pm 7,34 *$	$2,40 \pm 0,04 *$	$680,50 \pm 5,05 *$
Целюлоза	$0,95 \pm 0,03 *$	$169,17 \pm 2,47 *$	$1,15 \pm 0,01 *$	$290,20 \pm 12,50 *$

Примітка. «\*» – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Таблиця 7.4

Матриця планування складу ГПС та результати росту і каталазної активності штаму F-vv *Flammulina velutipes*

№ живильного середовища	Фактори					АСБ, г/ дм <sup>3</sup>	КА <sub>ПТ</sub> КФ, мкат/мг
	x <sub>1</sub> (глюкоза)	x <sub>2</sub> (пептон)	x <sub>3</sub> (КН <sub>2</sub> РО)	x <sub>4</sub> (К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> )	Взаємодія факторів		
	Вміст у живильному середовищі, г/ дм <sup>3</sup>						
1	2	3	4	5	6	7	8
1	8	1	0,4	0,2	1	3,20 ± 0,05 *	500,20 ± 12,05 *
2	12	1	0,4	0,2	x <sub>1</sub>	3,95 ± 0,20 *	683,28 ± 5,69 *
3	8	5	0,4	0,2	x <sub>2</sub>	3,90 ± 0,55	668,66 ± 1,98 *
4	12	5	0,4	0,2	x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	6,49 ± 0,03 *	752,74 ± 6,03 *
5	8	1	0,8	0,2	x <sub>3</sub>	3,00 ± 0,10 *	550,00 ± 1,55 *
6	12	1	0,8	0,2	x <sub>1</sub> x <sub>3</sub>	5,82 ± 0,22 *	980,45 ± 8,15 *
7	8	5	0,8	0,2	x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	2,77 ± 0,09 *	748,84 ± 10,76 *
8	12	5	0,8	0,2	x <sub>1</sub> x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	6,49 ± 0,23 *	770,03 ± 1,32 *
9	8	1	0,4	0,6	x <sub>4</sub>	3,21 ± 0,11	859,49 ± 12,03
10	12	1	0,4	0,6	x <sub>1</sub> x <sub>4</sub>	4,50 ± 0,05 *	900,00 ± 12,05

Продовж. табл. 7.4

1	2	3	4	5	6	7	8
11	8	5	0,4	0,6	$x_2x_4$	$3,90 \pm 0,15 *$	$437,70 \pm 11,40 *$
12	12	5	0,4	0,6	$x_1x_2x_4$	$6,85 \pm 0,15 *$	$1190,00 \pm 10,76 *$
13	8	1	0,8	0,6	$x_3x_4$	$3,27 \pm 0,13$	$507,86 \pm 1,60 *$
14	12	1	0,8	0,6	$x_1x_3x_4$	$3,10 \pm 0,02 *$	$609,45 \pm 4,51 *$
15	8	5	0,8	0,6	$x_2x_3x_4$	$3,28 \pm 0,09$	$570,50 \pm 15,01 *$
16	12	5	0,8	0,6	$x_1x_2x_3x_4$	$6,68 \pm 0,13 *$	$1018,50 \pm 9,25 *$
17 (контроль)	10	3	0,6	0,4	0	$3,35 \pm 0,05$	$860,10 \pm 5,05$

Примітка. «\*» – різниця достовірна у порівнянні з контролем



Середовище № 12 мало максимальний вміст глюкози, пептону і  $K_2HPO_4$ . Отже, живильне середовище № 12 наступного складу, г/ дм<sup>3</sup>: глюкоза – 12; пептон – 5;  $KH_2PO_4$  – 0,4;  $K_2HPO_4$  – 0,6;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5;  $CaCl_2$  – 0,05;  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  – 0,001; дистильована вода до 1 дм<sup>3</sup> є найбільш придатним, з досліджених, для росту штаму F-vv *F. velutipes*.

Разом з ростовими показниками, реєстрували і вплив факторів – співвідношення компонентів живильного середовища на КА штаму F-vv. Так, найбільша КА<sub>пт</sub> КФ штаму F-vv *F. velutipes* зафіксована при культивуванні на живильному середовищі № 12, а також на середовищах № 16 і 6 в порядку убування активності ензиму.

Отже, живильне середовище № 12 наступного складу, г/ дм<sup>3</sup>: глюкоза – 12; пептон – 5;  $KH_2PO_4$  – 0,4;  $K_2HPO_4$  – 0,6;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5;  $CaCl_2$  – 0,05;  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  – 0,001; дистильована вода до 1 дм<sup>3</sup> є найбільш придатним для біосинтезу каталази штамом F-vv *F. velutipes*.

В низці досліджень встановлено, що зміна каталазної активності відбувається і при реакції організму на інші різноманітні дії зовнішнього середовища та стани розвитку. Активізація оксидоредуктаз і зокрема каталазної активності є компонентом захисної реакції організму та інформує про наявність певних, в тому числі і дестабілізуючих факторів його розвитку [17, 59, 258]. Цікаво використати такі дані для регуляції ферментативної активності культур базидієвих грибів чи в індикації певних біотехнологічних процесів і екологічних станів.

Наступним етапом виконання цього розділу роботи було вивчення характеру впливу певних хімічних речовин на ріст та каталазну активність штамів P-er *P. eryngii*, Fh-08 *F. hepatica* та 960 *A. cylindracea* (рис. 7.3).

Найвищий ступінь індукції КА міцелію зафіксовано при додаванні: таніну – на 108±2%, через 48 годин експозиції, всіх штамів; лігносульфонату натрію – на 125%, 24 год., штаму 960; перекису водню – на 115%, 48 год., штаму P-er. При внесенні до культуральної рідини галової кислоти

спостерігали або відсутність реакції, або репресію КА – найбільша – на 82%, 24 год., штаму P-er. Біотехнологічне значення цього – можливість регуляції (індукція чи репресія) КА потенційних продуцентів ферменту каталази.

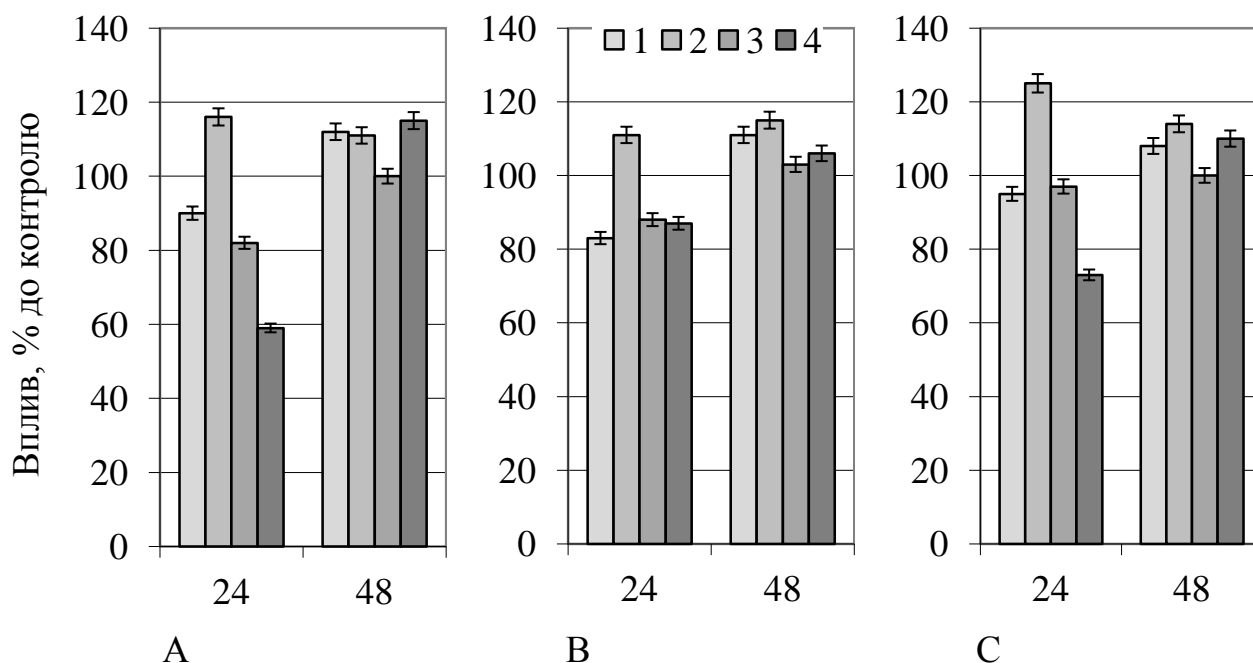


Рис. 7.3. Вплив таніну (1), лігносульфонату натрію (2), галової кислоти (3) та перекису водню (4) на КА міцелію штамів P-er *Pleurotus eryngii* (A), Fh-08 *Fistulina hepatica* (B) та 960 *Agrocybe cylindracea* (C)

Отже, встановлено вплив певних хімічних речовин на каталазну активність. Продовженням цього етапу дослідження стало вивчення впливу різних концентрацій лігносульфонату на КА штамів P-01 *P. ostreatus* і F-vv *F. velutipes*. Внесення лігносульфонату здійснювали у оптимізоване глюкозо-пептонне живильне середовище у концентраціях 0,1; 0,4; 0,7; 1,0; 1,3 та 1,6%. Через те, отримали шість варіантів живильного середовища, на яких штами культивували в стандартних умовах (табл. 7.5).

Встановлено, що максимальні як ріст так і КА штаму P-01 *P. ostreatus* спостерігаються при концентрації лігносульфонату від 0,7 до 1%, а штаму F-vv *F. velutipes* – від 0,4 до 0,7%.

Таблиця 7.5

**Вплив лігносульфонату натрію на ріст та каталазну активність  
штамів базидієвих грибів**

Концентрація лігносульфонату, %	АСБ, г/ дм <sup>3</sup>	КА <sub>ПТ</sub> КФ, мкат/мг	Вплив, % до контролю
<b>Штам Р-01 <i>P. ostreatus</i></b>			
0,1	3,93 ± 0,03	1209,56 ± 7,81 *	112
0,4	4,10 ± 0,01 *	1220,48 ± 10,09 *	113
0,7	4,78 ± 0,05 *	1296,29 ± 6,83 *	120
1,0	4,07 ± 0,11 *	1285,07 ± 7,09 *	119
1,3	3,71 ± 0,28	993,54 ± 14,00 *	92
1,6	3,66 ± 0,12	918,67 ± 14,92 *	85
0, контроль	3,55 ± 0,02	1080,00 ± 6,50	-
<b>Штам F-vv <i>F. velutipes</i></b>			
0,1	6,85 ± 0,10	1297,15 ± 7,81 *	109
0,4	7,10 ± 0,01	1392,68 ± 10,03 *	117
0,7	7,20 ± 0,05 *	1404,30 ± 11,60 *	118
1,0	7,07 ± 0,31	1249,07 ± 9,11 *	105
1,3	7,10 ± 0,28	1071,34 ± 10,50 *	90
1,6	7,06 ± 0,12	892,00 ± 9,02 *	75
0, контроль	6,85 ± 0,15	1190,00 ± 10,76	-

Примітка. «\*» – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Таким чином, оптимізоване глюкозо-пептонне середовище при наступному співвідношенні компонентів, г/ дм<sup>3</sup>: глюкоза – 12; пептон – 1; КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 0,8; К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> – 0,2; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 0,5; CaCl<sub>2</sub> – 0,05; ZnSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 0,001; лігносульфонат – 7-10% (шт. Р-01) і 4-7% (шт. F-vv); дистильована вода – до 1 дм<sup>3</sup> є оптимальним для культивування штамів Р-01

*P. ostreatus* і F-vv *F. velutipes* – продуцентів каталази.

Роботи з розробки модифікацій живильних середовищ для інших штамів-продуцентів проводили за наведеною вище схемою. Зокрема, встановлено склад оптимізованого глюкозо-пептонного середовища: глюкоза – 12; пептон – 1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,8;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,2;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{CaCl}_2$  – 0,05;  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001; лігносульфонат – 7-10% та дистильована вода – до 1 дм<sup>3</sup> для культивування штаму Р-6v *P. ostreatus*.

У промисловості для одержання препаратів БАР з використанням мікроорганізмів-продуцентів застосовують поверхневий, глибинний, гетерофазний методи культивування. Кожний з цих методів має свої переваги і недоліки. Враховуючи це, крім поверхневого, був випробуваний і глибинний метод вирощування штамів-продуцентів на удосконаленому ГПС в ферментерах (Додаток Б) [66] і у колбах Ерленмейєра на шейкерній мішалці при 20 об/ хв., 27,5°C. Результати такого культивування, зокрема, дозволили скоротити його термін до 10 діб та підвищити вихід біомаси до 14 г/дм<sup>3</sup>, збільшення КА культур не зафіксоване. Отже, підбір складу живильного середовища та вибір способу ферментації може спростувати і здешевлювати виробництво цільового продукту.

### **7.1.3. Модифікація способів виділення та основні фізико-біохімічні властивості ферментних препаратів каталаз**

Проведений скринінг дозволив виявити штами з високим рівнем КА в культурі, удосконалення живильного середовища та способу ферментації – продовжити роботи з експериментального культивування штамів-продуцентів з метою отримання ферментних препаратів (ФП) каталази та дослідження їх основних фізико-біохімічних властивостей.

Модифікацію способів виділення ФП здійснювали шляхом експериментального визначення співвідношення кількості внесеного

інокулюму до об'єму поживного середовища, асептичності і терміну культивування продуцентів, аналітичної розтитровки концентрації  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  осадження потрібного ферменту, терміну і умов діалізу.

Осадження білків за фракціями з водного екстракту гомогенату міцелію здійснювали шляхом додавання сульфату амонію в інтервалі 60-80%. Вихід ФП КА становив  $0,18 \pm 0,02$  г з 1 кг міцелію ( $Q_p = 6,25 \times 10^{-4}$  г/дм<sup>3</sup>×год;  $Y_{p/s} = 1,5 \times 10^{-2}$  г/г) та  $0,15 \pm 0,02$  г з 1 дм<sup>3</sup> КФ ( $Q_p = 5,21 \times 10^{-4}$  г/дм<sup>3</sup>×год;  $Y_{p/s} = 1,3 \times 10^{-2}$  г/г).

Каталазна активність (Е) отриманих ферментних препаратів не поступається активності промислових препаратів і становить:

- штаму F-vv *F. velutipes* –  $E_{\text{МГ}} = 1320,5$  мкат/мг,  $E_{\text{КФ}} = 4077,9$  мкат/мг.
- штаму P-01 *P. ostreatus* –  $E_{\text{МГ}} = 1500,3$  мкат/мг,  $E_{\text{КФ}} = 9593,5$  мкат/мг.

Масовий процент вмісту зв'язаних амінокислот і білка у ФП КА має індивідуальний характер (табл. 7.6; рис. А.1; Додаток А), амінокислоти розташовані залежно від природи радикалів – амфотерності. Вміст білка в ФП міцеліальної каталази перевищує 55%. Це, скоріше за все, пояснюється точністю фракціонування і ступенем очистки: наявністю в них високополімерних полісахаридів і інших сполук.

На вміст гліцину з полярних, гідрофільних амінокислот в ФП впливає, скоріше за все, внесення у живильне середовище пептону ферментативного, що має у складі до 2,22% цієї амінокислоти від вмісту азоту.

Досліджені білки ФП можна було б віднести до кислих вже тільки за кількістю негативно заряджених аспарагінової і глутамінової амінокислот. Але це припущення вірне в тому разі, коли в білках вони не знаходяться у вигляді глутаміну і аспарагіну, що при кислотному гідролізі довести не можливо. Побічним показником переваги у структурі білків ФП кислих амінокислот може бути те, що 0,1%-ний водний розчин ферменту

- штаму F-vv мав 6,2 рН;
- штаму P-01 – 5,3 рН.

Таблиця 7.6

**Амінокислотний склад ферментних препаратів каталази штамів  
базидієвих грибів F-vv *Flammulina velutipes* і P-01 *Pleurotus ostreatus***

№ з/ п	Амінокислота	Вміст амінокислот, мг %	
		ФП штаму F-vv	ФП штаму P-01
1.	Ала (Ala, A)	4,52	3,65
2.	Вал (Val, V) *	5,95	5,21
3.	Лей (Leu, L) *	5,36	6,71
4.	Іле (Ile, I) *	5,79	5,30
5.	О-про (Hyp, hP)	6,20	5,04
6.	Про (Pro, P)	7,32	5,01
7.	Фен (Phe, F) *	1,71	1,60
8.	Мет (Met, M) *	3,93	2,46
9.	Глі (Gly, G)	3,84	3,85
10.	Сер (Ser, S)	5,67	4,53
11.	Тре (Thr, T) *	0,96	0,54
12.	Цис (Cys, C)	6,02	4,93
13.	Тир (Tyr, Y)	14,33	17,68
14.	Асп (Asp, D)	12,18	19,19
15.	Глу (Glu, E)	5,34	5,34
16.	Ліз (Lys, K) *	7,19	5,56
17.	Арг (Arg, R) *	3,69	3,40
% білка в ФП:		55,8326	57,0671

Примітка. «\*» – незамінні амінокислоти, (в дужках) – аббревіатура

Вміст у ферментних білках основних, позитивно заряджених амінокислот аргініну та гістидину є значно нижчим, ніж попередніх і не може суттєво впливати на природу протеїну.

Кожен із зазначених класів амінокислот вирізняється особливостями

спеціалізованих шляхів обміну, їх метаболізм має важливе фізіологічне значення. Так, завдяки процесам обміну трьох амінокислот з полярними (гідрофільними) незарядженими R-групами – гліцину, глутаміну та цистеїну – утворюється надзвичайно важлива біологічно активна речовина – глутатіон. Він є надзвичайно важливим компонентом антиоксидантного захисту та виконує відповідні численні функції.

Таким чином, вперше отримані грибні ФП каталаз штаму F-vv *F. velutipes* і штаму P-01 *P. ostreatus* мають індивідуальні характеристики. Встановлено масовий процент вмісту білка і амінокислот у білках грибних ФП каталаз, який свідчить про їх кислу природу і підтверджується значеннями рН водних розчинів. В атестованих лабораторіях проведено експертизу та дослідження токсичності ферментних препаратів каталаз (Додаток Е), які підтвердили їх характеристики та відповідність вимогам за показниками безпеки.

## **7.2. Пероксидази**

### **7.2.1. Пероксидазна активність штамів базидієвих грибів**

Як уже зазначалося, отримання грибних біологічно активних речовин та створення на їх основі промислових агентів, високоефективних і нетоксичних лікарських препаратів, компонентів харчових продуктів є актуальним завданням розвитку сучасної біотехнології [14, 20, 36, 121].

Серед численних БАР, особливе місце займають пероксидази (КФ 1.1.11.7) – ензими класу оксидоредуктаз, що каталізують окислення різних електронодонорних субстратів за допомогою  $H_2O_2$ . Відомо, що пероксидаза має не лише пероксидазні, а й оксидазні властивості: каталізує окиснення цілого ряду сполук за рахунок неактивованого молекулярного кисню. Наявні експериментальні дані свідчать про те, що пероксидаза пов'язана з цілим рядом метаболічних перетворень, які відбуваються в

клітинах. Зокрема, цей ензим бере активну участь у процесах делігніфікації деревини і регуляції процесів перекисного окиснення ліпідів, що може лягти в основу розробки нових технологій енергоощадних технологій переробки складних хімічно стійких сполук [7, 124, 130].

Пероксидази знайшли широке практичне застосування і є основним реагентом в медичних діагностичних тест-системах імуноензимного аналізу і препаратах для лікування цілого ряду вірусних, бактеріальних, онкологічних захворювань. Цей ензим також застосовується у фундаментальних дослідженнях в області біотехнології і медицини, загальної біології і екології та є основою біосенсорів, хемі- та біolumінесцентних датчиків. Наукові розробки стали базою широкого використання пероксидази в різних галузях промисловості [49, 50].

Унікальні властивості цього ензиму, розчинність в воді, висока специфічність за окисником, стійкість при зберіганні, широкий спектр застосування і висока вартість чистого препарату стимулювали активний пошук нових джерел його одержання.

Отже, виходячи з вищезазначеного, метою цього етапу роботи було встановлення пероксидазної активності (ПА), скринінг штамів базидієвих грибів – активних продуцентів пероксидази при їх періодичному поверхневому культивуванні на ГПС.

За отриманими показниками вираховували ПА<sub>ПТ</sub> міцелію (рис. 7.4) та культурального фільтрату (рис. 7.5) досліджуваних штамів базидієвих грибів.

Встановлено, що для 79% досліджених штамів характерна позитивна кореляція ПА<sub>ПТ</sub> міцелію та швидкості накопичення АСБ: найвищий рівень цих обох показників відповідає 12-тій добі культивування.

Питома ПА міцелію 12 штамів: P-004, P-035, P-039, P-081, P-089, P-183, P-6v *P. ostreatus*, Fh-08 *F. hepatica*, Ls-08 *L. sulphureus*, 167 *A. cylindracea* та F-104 і F-2 *F. velutipes* знижується з 9-тої до 12-тої доби ферментації.



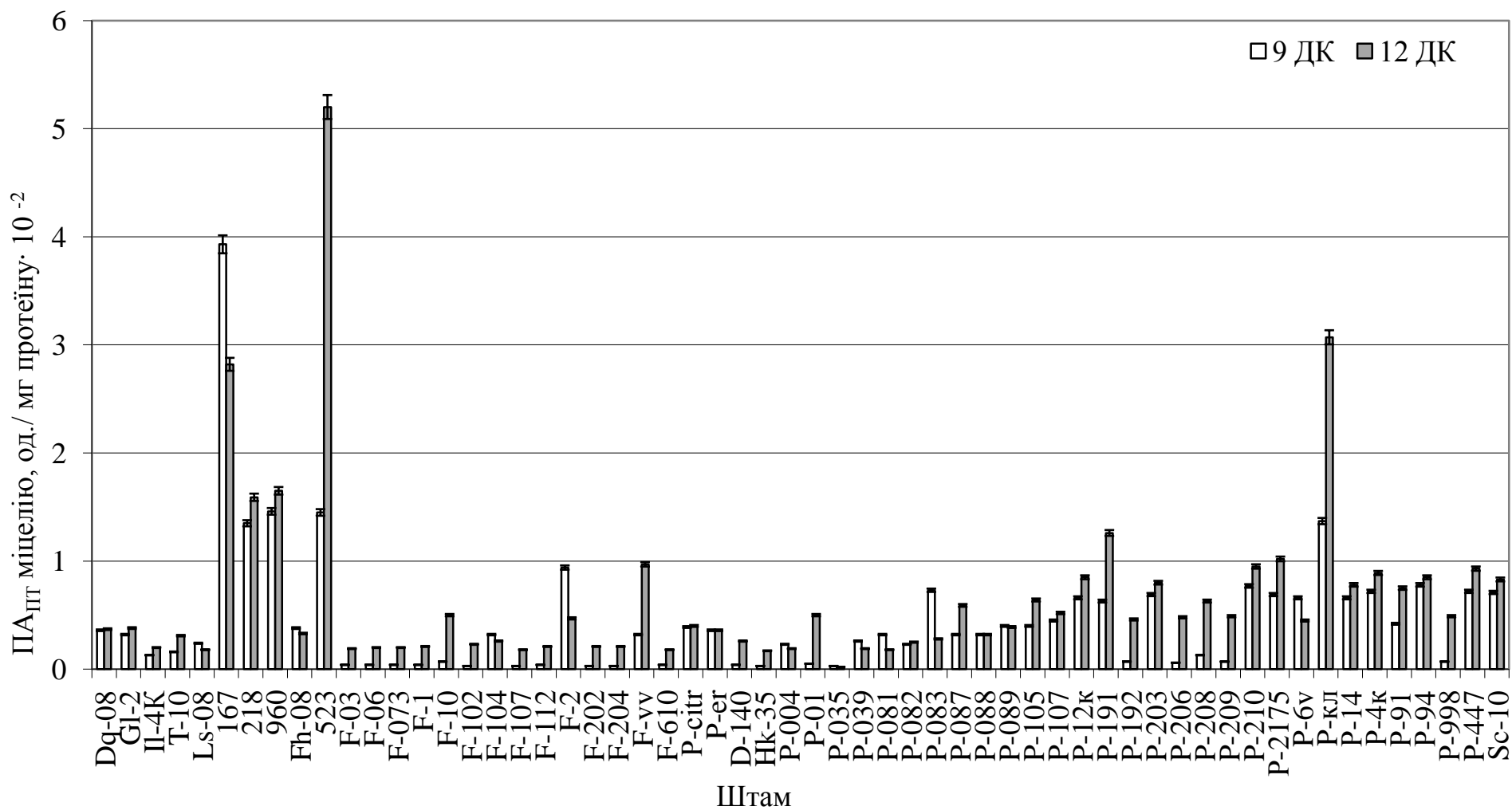


Рис. 7.4. Питома пероксидазна активність міцелію штамів базидієвих грибів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування

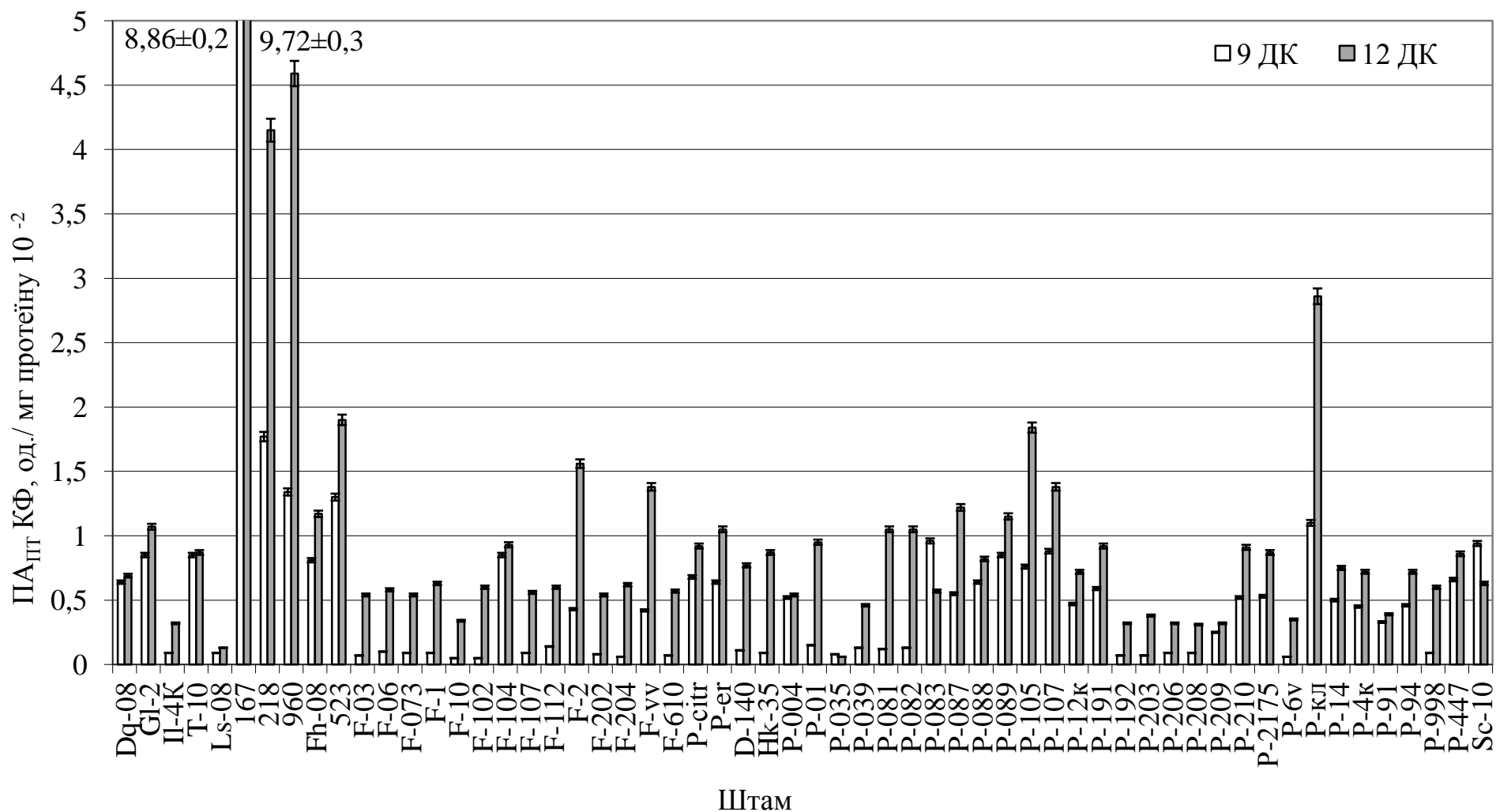


Рис. 7.5. Питома пероксидазна активність культурального фільтрату штамів базидієвих грибів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування

Максимум ПА<sub>ПТ</sub> КФ більшості штамів також відповідає найвищому рівню АСБ, тобто 12-тій добі культивування. ПА<sub>ПТ</sub> КФ лише двох штамів: Р-035 *P. ostreatus* та Sc-10 *S. commune* знижується наприкінці терміну росту. Ймовірно, це пов'язано з субстратною регуляцією активності ензиму та індивідуальними характеристиками цих штамів.

За даними дослідження, для 74% досліджених штамів базидієвих грибів характерний більш високий рівень питомої пероксидазної активності у КФ в порівнянні з міцелієм. Для решти культур, серед яких переважну більшість складають штами *P. ostreatus*, зафіксовано більш високий рівень ПА<sub>ПТ</sub> в міцелії.

Абсолютний максимум ПА<sub>ПТ</sub> як міцелію, так і КФ зафіксований для штаму 167 *A. cylindracea*. Звертає на себе увагу штам Р-кл *P. ostreatus*, який може розглядатися як другий перспективний продуцент міцеліальної, внутрішньоклітинної пероксидази. Пероксидазна активність його міцелію в 2,87 рази нижча за активність штаму 167 *A. cylindracea* на 9-ту добу, та у 0,91 разів вища – на 12-ту добу культивування.

В якості ж продуцентів екзогенної пероксидази можуть бути використані штами 960 і 218 *A. cylindracea*, 523 *L. edodes* та Р-кл *P. ostreatus*, пероксидазна активність культурального фільтрату яких в 2,12, 2,34 та 3,40 рази, відповідно, нижча за ПА<sub>ПТ</sub> штаму 167 *A. cylindracea* на 12 добу ферментації.

Для порівняння отриманих даних, зазначимо, що ПА<sub>ПТ</sub> *crude*-екстракту оболонки насіння сої (*Glycine max* (L.) Merr.) – одного з джерел промислового отримання ензиму пероксидази складає 8,26 Е/мг [50]. Досліджено пероксидазну активність значної кількості штамів базидіальних грибів, однак їх результати складно порівняти з отриманими нами даними, оскільки вивчались інші види грибів та застосовувались різні методи визначення ПА [50].

Таким чином, проведені дослідження дозволили виявити штами

базидієвих грибів, що характеризуються порівняно високою пероксидазною активністю як в міцелії, так і в культуральному фільтраті. Подальша оптимізація умов їх культивування дозволить рекомендувати біосинтетично активні штами базидієвих грибів, до використання у біотехнології в якості продуцентів пероксидаз.

### **7.2.2. Вплив окремих сполук на біосинтез пероксидаз біосинтетично активними штамами**

Незважаючи на більш як столітню історію, інтерес до вивчення і використання пероксидаз не знижується. Пероксидази коренів хрону (*Armoracia rusticana*, HRP) є найбільш широко вживаним ферментом в імуноферментних діагностичних наборах з спектрофотометричною детекцією. Наприкінці минулого століття розроблено і втілено хемілюмінесцентний аналіз з використанням HRP. В наш час на основі рекомбінантних пероксидаз розроблюються чутливі біосенсиори для визначення різноманітних сполук у багатокомпонентних сумішах та при аналізі забруднення довкілля.

В останні роки на ринку з'явилися препарати пероксидаз із нових джерел. До них відноситься грибна пероксидаза (*Coprinus cinereus*), яка виробляється в комерційних масштабах в нативній і рекомбінантній формах; пероксидаза із відходів виробництва соєвих бобів (*Glycine max* (L.) Merr.) та пероксидаза із надпродуктивної культури клітин батату (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Надзвичайно високою термостабільністю відрізняються отримані препарати пероксидази пальм [127]. Треба відмітити, що найбільш перспективним ферментом для практичного використання є рекомбінантний варіант грибної пероксидази, який відрізняється високою стабільністю в екстремальних умовах [127].

Повідомляється, що стимулюючий ефект на біосинтез ферменту

пероксидаза базидіальним грибом *Phellinus robustus* спричиняють: ростостимулюючі добавки – кукурудзяний, дріжджовий і солодовий екстракти, вівсяна мука і пивне сусло; попередники біосинтезу порфіринів; лігноцелюлозні субстрати; мономіри-попередники біосинтезу лігніну і інші сполуки [127].

Однак, такі публікації є поодинокі та надають дані з вивчення одного чи декількох штамів, вплив же хімічних речовин на біосинтез пероксидаз базидіомікотовими різних видів залишається невивченим.

Відповідно до поставленої цілі дослідження, вивчали вплив таких фенольних речовин як танін, галова кислота і лігносульфонат натрію, а також перекису водню та вітамінів – аскорбінова і нікотинова кислота на пероксидазну активність біосинтетично активних штамів базидієвих грибів.

Штами культивували в стандартних умовах. На 12-ту добу культивування у дослідні колби додавали стерильні водні розчини відповідних хімічних речовин, а у контрольні – стерильну дистильовану воду. Концентрації речовин, що вносили, були встановлені у попередніх дослідженнях, які показали невірогідний вплив більш низьких концентрацій речовин та гальмування росту культур при більш високих концентраціях дослідних речовин. Пероксидазну активність в міцелії вимірювали через 24 і 48 годин експозиції речовин (рис. 7.6).

Найвищий ступінь індукції ПА міцелію зафіксовано при додаванні: таніну – на 109%, через 48 годин експозиції, штаму Fh-08; лігносульфонату натрію – на  $119 \pm 1\%$ , 24 год., штамів Р-ег і 960 та 48 год., штамів Fh-08 і 960; перекису водню – на 121%, 48 год., штаму Р-ег. Додавання до культуральної рідини галової кислоти веде або до відсутності реакції, або до репресії ПА – найбільша – на 77%, 24 год., штаму Р-ег.

Також досліджували вплив вітамінів – аскорбінової та нікотинової кислот на зміну пероксидазної активності штамів Р-01 *P. ostreatus*, F-vv *F. velutipes* та 523 *L. edodes* (досліджували винятково тільки в цьому розділі,

що зумовлено високою ПА цієї культури).

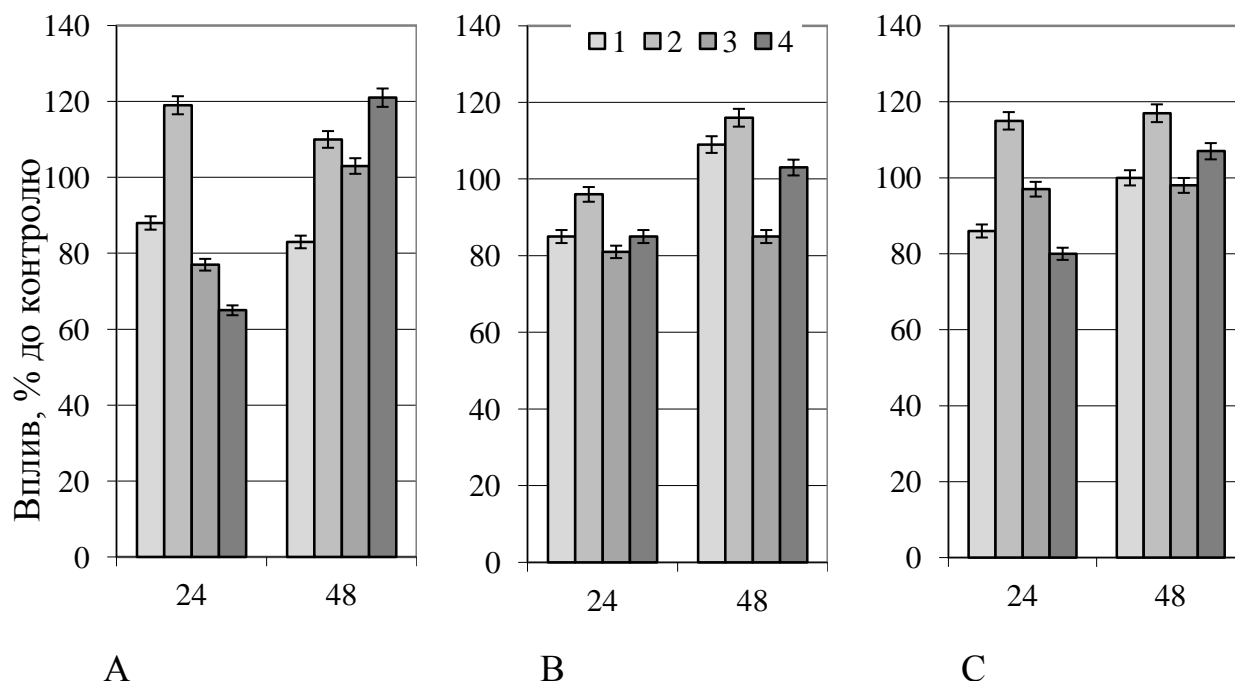


Рис. 7.6. Вплив таніну (1), лігносульфонату натрію (2), галової кислоти (3) та перекису водню (4) на пероксидазну активність міцелію штамів *P-er Pleurotus eryngii* (A), *Fh-08 Fistulina hepatica* (B) та *960 Agrocybe cylindracea* (C)

Штами культивували на ГПС при 27,5°C протягом 20 діб. Аскорбінову кислоту в концентраціях 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 мкмоль/ дм<sup>3</sup> стерильно вносили в культуральну рідину за 24 години до визначення пероксидазної активності культур. Концентрації аскорбінової кислоти в культуральній рідині та час визначення ПА обрані згідно попередніх досліджень, які показали відсутність вірогідного впливу на ПА цих штамів концентрацій нижче 0,5 мкмоль/ дм<sup>3</sup>, та її пригнічення при концентраціях вище 10,0 мкмоль/ дм<sup>3</sup> на 24 годину після внесення вітаміну.

Експериментальні дані дослідів представлені в таблиці 7.7.

Вони показують, що спостерігаються два піки максимальної ПА штамів, які відповідають концентраціям вітаміну С – 0,5 і 10,0 мкмоль/ дм<sup>3</sup>.

Таблиця 7.7

**Вплив аскорбінової кислоти на пероксидазну активність штамів  
деяких видів базидієвих грибів**

Концентрація вітаміну С, мкмоль/ дм <sup>3</sup>	ПА <sub>ПТ</sub> , од./ мг × 10 <sup>-2</sup>			
	Міцелій	Вплив, % до контролю	КФ	Вплив, % до контролю
<b>Штам Р-01 <i>Pleurotus ostreatus</i></b>				
0,5	0,75 ± 0,08 *	151	1,32 ± 0,01 *	145
1	0,32 ± 0,06 *	64	0,54 ± 0,01 *	57
5	0,54 ± 0,01	109	0,77 ± 0,09 *	81
10	0,71 ± 0,03 *	141	1,36 ± 0,01 *	143
Контроль, 0	0,51 ± 0,04	-	0,95 ± 0,05	-
<b>Штам F-vv <i>Flammulina velutipes</i></b>				
0,5	1,58 ± 0,03 *	163	2,22 ± 0,02 *	161
1	0,57 ± 0,02 *	59	1,51 ± 0,05	109
5	1,07 ± 0,03 *	110	1,68 ± 0,03 *	122
10	1,79 ± 0,07 *	184	2,72 ± 0,03 *	196
Контроль, 0	0,96 ± 0,04	-	1,37 ± 0,05	-
<b>Штам 523 <i>Lentinus edodes</i></b>				
0,5	9,8 ± 0,04 *	188	5,2 ± 0,05 *	174
1	2,9 ± 0,04 *	56	2,6 ± 0,01 *	137
5	6,3 ± 0,09 *	121	3,0 ± 0,13 *	158
10	12,0 ± 0,06 *	231	6,0 ± 0,01 *	316
Контроль, 0	5,2 ± 0,06	-	1,9 ± 0,04	-

Примітка. «\*» – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Таблиця 7.8

**Вплив нікотинової кислоти на пероксидазну активність штамів  
деяких видів базидієвих грибів**

Концентрація вітаміну РР, мкмоль/ дм <sup>3</sup>	ПА <sub>ПТ</sub> , од./ мг × 10 <sup>-2</sup>			
	Міцелій	Вплив, % до контролю	КФ	Вплив, % до контролю
<b>Штам Р-01 <i>Pleurotus ostreatus</i></b>				
0,5	0,64 ± 0,01 *	128	1,05 ± 0,03 *	111
1	0,57 ± 0,02 *	113	0,51 ± 0,00 *	54
5	0,63 ± 0,01 *	128	0,95 ± 0,09	100
10	0,57 ± 0,07	115	0,72 ± 0,02 *	76
Контроль, 0	0,51 ± 0,04	-	0,95 ± 0,05	-
<b>Штам F-vv <i>Flammulina velutipes</i></b>				
0,5	1,99 ± 1,03 *	208	3,05 ± 0,01 *	221
1	1,56 ± 0,02 *	162	2,61 ± 0,01 *	189
5	1,32 ± 0,03 *	137	1,57 ± 0,03 *	114
10	1,88 ± 0,07 *	195	2,79 ± 0,02 *	196
Контроль, 0	0,96 ± 0,04	-	1,37 ± 0,05	-
<b>Штам 523 <i>Lentinus edodes</i></b>				
0,5	18,3 ± 0,75 *	352	8,3 ± 0,08 *	437
1	9,2 ± 0,41 *	177	5,1 ± 0,11 *	268
5	8,0 ± 0,63 *	154	5,1 ± 0,01 *	268
10	12,1 ± 0,64 *	233	9,1 ± 0,03 *	479
Контроль, 0	5,2 ± 0,04	-	1,9 ± 0,04	-

Примітка. «\*» – різниця достовірна у порівнянні з контролем



При аналогічних умовах культивування вивчали вплив нікотинової кислоти на пероксидазну активність цих же штамів їстівних базидіомікотових (табл. 7.8).

Аналіз її даних говорить про те, що пероксидазна активність в міцелії та культуральному фільтраті дослідних штамів змінюється при внесенні у культуральну рідину вітаміну РР. Спостерігаються два піки максимальної пероксидазної активності, що відповідають концентраціям вітаміну РР:

- 0,5 і 10,0 мкмоль/ дм<sup>3</sup> для штамів F-vv *F. velutipes* та 523 *L. edodes*;
- 0,5 і 5,0 мкмоль/ дм<sup>3</sup> – для штаму Р-01 *P. ostreatus*.

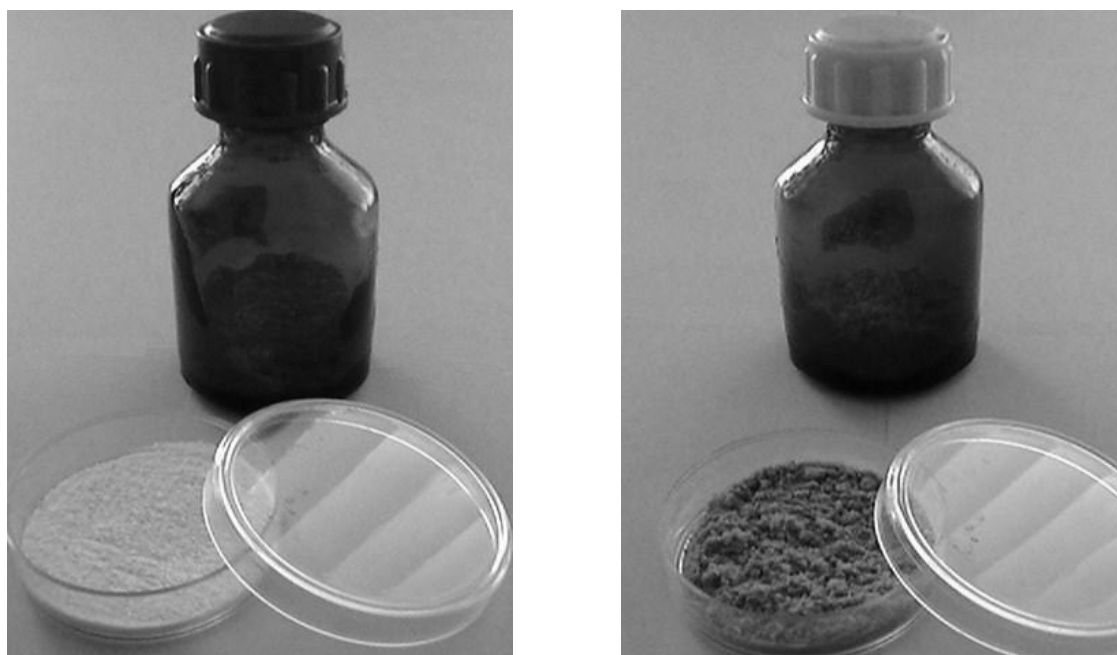
Таким чином, отримані результати показали, що ПА досліджених штамів базидієвих грибів *P. ostreatus*, *F. velutipes* та *L. edodes* змінюється під впливом аскорбінової і нікотинової кислот. Піки максимальної ПА відповідають концентрації вітаміну С – 0,5 і 10,0 мкмоль/дм<sup>3</sup> та концентрації вітаміну РР – 0,5 і 10,0 мкмоль/дм<sup>3</sup> для штаму F-vv *F. velutipes* і штаму 523 *L. edodes* та 0,5 і 5,0 мкмоль/дм<sup>3</sup> – для штаму Р-01 *P. ostreatus*. Застосовані вітаміни С і РР слід розглядати як фактори росту, адже як зазначається, застосування терміна «індукція» не завжди коректне. Здебільшого може йтися про первинний фізіологічний сигнал. Справжній (істинний) індуктор локалізований у клітині, отже необхідною є наявність відповідної транспортної системи для перенесення даної речовини в клітину [121].

### **7.2.3. Модифікація способів виділення та основні фізико-біохімічні властивості ферментних препаратів пероксидаз**

Проведений первинний скринінг активних продуцентів серед низки штамів базидієвих грибів дозволив отримати штами з високим рівнем пероксидазної активності в культурі. Вивчена динаміка їх росту та пероксидазної активності [50-49]. У попередніх дослідках також було встановлено, що досліджувані гриби продукують інтра- і екстрацелюлярні

(екзо- і ендогенні) пероксидази. Отже, з метою отримання позаклітинних і міцеліальних пероксидаз, дослідні штами культивували за схемою (рис. 2.4). Культивування вели до максимальних значень пероксидазної активності. Осадження білків за фракціями з водного екстракту гомогенату міцелію та КФ здійснювали при температурі  $5\pm 1^\circ\text{C}$  шляхом додавання сульфату амонію до 40-70% та 40-60% насичення відповідно [144].

Отримані розчини фракцій білків піддавали ліофільній сушці та визначали ПА ферментних препаратів, які мають вид порошку від світло-сірого до світло-кремового забарвлення (рис. 7.7), добре розчинні у воді.



А

Б

Рис. 7.7. Грибні ферментні препарати пероксидази, виділені з міцелію (А) та культурального фільтрату (Б) шт. F-vv *F. velutipes* (1 : 2)

Вихід ферментних препаратів становив  $0,16\pm 0,02$  г з 1 кг міцелію та  $0,15\pm 0,02$  з 1 дм<sup>3</sup> культурального фільтрату.

Пероксидазна активність ферментних препаратів дорівнює:

– штаму 523 *L. edodes* –  $X_{\text{КФ}} = 4,47$  Е/ мг,  $X_{\text{МГ}} = 4,47$  Е/ мг;

- штаму F-vv *F. velutipes* –  $X_{\text{КФ}} = 4,77 \text{ Е/ мг}$ ,  $X_{\text{МГ}} = 9,10 \text{ Е/ мг}$ ;
- штаму Р-01 *P. ostreatus* –  $X_{\text{КФ}} = 3,43 \text{ Е/ мг}$ ,  $X_{\text{МГ}} = 3,23 \text{ Е/ мг}$ .

Масовий процент вмісту зв'язаних амінокислот і білка у ферментних препаратах грибних пероксидаз визначали за допомогою амінокислотного аналізатора моделі ААА-881, після кислотного гідролізу ФП.

Амінокислотний склад та дані про масовий процент вмісту білка в отриманих ферментних препаратах надано у таблиці 7.9 (рис. А.2-4, Додаток А), де амінокислоти розташовані залежно від природи радикалів (амфотерності) білкових молекул, (\*) – незамінні.

Таблиця 7.9

**Вміст білку і порівняльний амінокислотний склад ферментних препаратів пероксидаз штамів базидієвих грибів**

№ з/ п	Амінокислота	Вміст амінокислот, мг %	
		ФП <sub>КФ</sub>	ФП <sub>МГ</sub>
1	2	3	4
Штам 523 <i>Lentinus edodes</i>			
1.	Ала (Ala, A)	6,88	6,74
2.	Вал (Val, V) *	5,63	7,20
3.	Лей (Leu, L) *	8,74	8,91
4.	Іле (Ile, I) *	3,58	5,53
5.	О-про (Hyp, hP)	0,00	0,00
6.	Про (Pro, P)	8,34	2,12
7.	Фен (Phe, F) *	6,47	5,08
8.	Мет (Met, M) *	0,09	1,24
9.	Глі (Gly, G)	7,79	5,01
10.	Сер (Ser, S)	7,64	4,76
11.	Тре (Thr, T) *	6,85	5,20
12.	Цис (Cys, C)	3,43	0,35
13.	Тир (Tyr, Y)	5,58	4,10

Продовж. табл. 7.9

1	2	3	4
14.	Асп (Asp, D)	12,52	11,07
15.	Глу (Glu, E)	8,78	15,74
16.	Ліз (Lys, K) *	4,35	9,05
17.	Арг (Arg, R) *	1,37	7,62
18.	Гіс (His, H)	1,96	0,28
% білка в ФП:		20,0547	39,7189
Штам F-vv <i>Flammulina velutipes</i>			
1.	Ала (Ala, A)	2,32	2,15
2.	Вал (Val, V) *	5,34	4,06
3.	Лей (Leu, L) *	8,87	8,91
4.	Іле (Ile, I) *	5,56	6,25
5.	О-про (Hyp, hP)	0,00	0,00
6.	Про (Pro, P)	2,93	4,60
7.	Фен (Phe, F) *	10,03	4,93
8.	Мет (Met, M) *	5,57	2,07
9.	Глі (Gly, G)	4,80	7,01
10.	Сер (Ser, S)	3,53	3,00
11.	Тре (Thr, T) *	3,00	3,99
12.	Цис (Cys, C)	1,37	1,45
13.	Тир (Tyr, Y)	9,72	7,84
14.	Асп (Asp, D)	12,70	14,08
15.	Глу (Glu, E)	10,76	12,39
16.	Ліз (Lys, K) *	6,86	8,58
17.	Арг (Arg, R) *	4,04	5,74
18.	Гіс (His, H)	2,60	2,95
% білка в ФП:		39,6309	50,4938

Продовж. табл. 7.9

1	2	3	4
Штам P-01 <i>Pleurotus ostreatus</i>			
1.	Ала (Ala, A)	3,21	2,67
2.	Вал (Val, V) *	3,78	3,93
3.	Лей (Leu, L) *	9,32	8,51
4.	Іле (Ile, I) *	3,66	3,41
5.	О-про (Hyp, hP)	0,00	0,00
6.	Про (Pro, P)	3,31	3,94
7.	Фен (Phe, F) *	9,20	9,73
8.	Мет (Met, M) *	1,62	1,87
9.	Глі (Gly, G)	3,93	2,79
10.	Сер (Ser, S)	4,09	3,28
11.	Тре (Thr, T) *	3,44	3,65
12.	Цис (Cys, C)	1,07	0,29
13.	Тир (Tyr, Y)	8,76	9,09
14.	Асп (Asp, D)	15,56	15,38
15.	Глу (Glu, E)	13,11	12,40
16.	Ліз (Lys, K) *	8,12	9,73
17.	Арг (Arg, R) *	4,78	5,98
18.	Гіс (His, H)	3,04	3,35
% білка в ФП:		37,8145	42,4115

Примітка. «\*» – незамінні амінокислоти, (у дужках) – аббревіатура

Дані подаються без зазначення похибки, оскільки представляють точні результати амінокислотного аналізу по одному зразку ферментних препаратів екзо- і ендопероксидаз (ФП<sub>КФ</sub> і ФП<sub>МГ</sub>) досліджених штамів 523 *L. edodes*, F-vv *F. velutipes* і P-01 *P. ostreatus*.

Одержані дані що до вмісту амінокислот і білку свідчать про їх

індивідуальний характер досліджених білків і препаратів.

Як уже відмічалось, грибні ферментні препарати молокозсідальної дії екзогенної природи мали у складі білок від 17,4 (А-020 – *Fibuloporia mollusca*) до 43,6% (А-004 – *Amyloporia lenis*). Вміст білка в ФП міцеліальної каталази штаму F-vv *F. velutipes* і штаму Р-01 *P. ostreatus* незначно вищий 55% – перевищує такий згаданих молокозсідальних ферментів [158]. Вміст білка в ФП КФ пероксидази досліджених штамів знаходиться в межах від 20,06 до 39,63; а в ФП МГ – від 39,72 до 50,49. Найвищий вміст білку у ФП зафіксовано для штаму F-vv *F. velutipes*, найнижчий – для штаму 523 *L. edodes*.

Ферментні препарати отримані з культурального фільтрату містять меншу частку білку та незамінних амінокислот в порівнянні з ФП пероксидази з міцелію. Вміст білку в ФП згаданих молокозсідальних ферментів і пероксидаз скоріше за все пояснюється їх походженням та наявністю в них високополімерних полісахаридів.

Щодо амінокислотного складу досліджених білків, то на увагу заслуговує оксипролін з групи неполярних, гідрофобних амінокислот, який, на відміну від результатів аналізу ферментних препаратів молокозсідальної дії, не виявлено у складі білка пероксидаз штамів 523 *L. edodes*, F-vv *F. velutipes* і Р-01 *P. ostreatus*.

На вміст гліцину (Глі) з полярних, гідрофільних амінокислот в ФП впливає, скоріше за все, внесення у живильне середовище ферментативного пептону, що має у складі до 2,22% цієї амінокислоти від вмісту азоту [312].

Досліджені білки ФП можна було б віднести до кислих вже тільки за кількістю негативно заряджених аспарагінової (Асп) і глутамінової (Глу) амінокислот. Але це припущення вірне в тому разі, коли в білках вони не знаходяться у вигляді глутаміну і аспарагіну, що при кислотному гідролізі довести не можливо. Побічним показником переваги у структурі білків ФП кислих амінокислот може бути те, що 0,1%-ні водні розчини ферментних

препаратів виявили низький рівень рН, який дорівнював:

- ФП<sub>КФ</sub> – 4,85 та ФП<sub>МГ</sub> – 5,10 штаму 523 *L. edodes*;
- ФП<sub>КФ</sub> – 5,75 та ФП<sub>МГ</sub> – 5,80 штаму F-vv *F. velutipes*;
- ФП<sub>КФ</sub> – 5,38 та ФП<sub>МГ</sub> – 5,80 штаму P-01 *P. ostreatus*.

Вміст у ферментних білках основних, позитивно заряджених амінокислот аргініну (Арг) та гістидину (Гіс) є значно нижчим, ніж попередніх і не може суттєво впливати на природу протеїну.

Таким чином, вперше отримані ферментні препарати грибних пероксидаз екзо- і ендогенного походження штаму 523 *L. edodes*, штаму F-vv *F. velutipes* і штаму P-01 *P. ostreatus*. ФП пероксидаз мають індивідуальні характеристики вмісту білка, а білки – зв'язаних амінокислот. Встановлено масовий процент вмісту амінокислот у білках ФП грибних пероксидаз, який свідчить про кислу природу білків та підтверджується значеннями рН їх водних розчинів. В атестованих лабораторіях проведено експертизу та дослідження токсичності ФП пероксидаз (Додаток Е), які підтвердили їх характеристики та відповідність вимогам за показниками безпеки.

### Висновки до розділу 7

1. Встановлено каталазну та пероксидазну активності штамів базидієвих грибів. Відібрані перспективні штами: T-10 *Fomes fomentarius*, F-2 і F-vv *Flammulina velutipes* – продуценти інтрацелюлярних каталаз; P-208, P-01 *Pleurotus ostreatus*, F-vv *Flammulina velutipes*, P-citr *Pleurotus citrinopileatus* – екстрацелюлярних каталаз; 167 *Agrocybe cylindracea*, P-кл *Pleurotus ostreatus* – продуценти інтрацелюлярних пероксидаз та 960, 218 *Agrocybe cylindracea*, 523 *Lentinula edodes* та P-кл, P-01 *Pleurotus ostreatus* – екстрацелюлярних пероксидаз.
2. Вперше показана можливість регуляції (індукції чи репресії) каталазну та пероксидазну активності штамів базидієвих грибів

шляхом несення до культуральної рідини таніну, лігносульфонату натрію, галової кислоти і перекису водню.

3. Найвищий ступінь індукції КА міцелію зафіксовано при додаванні: таніну – на  $108 \pm 2\%$ , через 48 годин експозиції, всіх штамів; лігносульфонату натрію – на  $125\%$ , 24 год., штаму 960; перекису водню – на  $115\%$ , 48 год., штаму P-er. При внесенні до культуральної рідини галової кислоти спостерігали або відсутність реакції, або репресію КА – найбільша – на  $82\%$ , 24 год., штаму P-er.
4. Максимальну індукцію ПА міцелію зафіксовано при додаванні: таніну – на  $109\%$ , через 48 годин експозиції, штаму Fh-08; лігносульфонату натрію – на  $119 \pm 1\%$ , 24 год., штамів P-er і 960 та 48 год., штамів Fh-08 і 960; перекису водню – на  $121\%$ , 48 год., штаму P-er. Додавання до культуральної рідини галової кислоти веде або до відсутності реакції, або до репресії ПА – найбільша – на  $77\%$ , 24 год., штаму P-er.
5. На основі удосконалення складу живильного середовища та способу отримання, вперше виділені грибні ферментні препарати інтрацелюлярних каталаз штамів *Pleurotus ostreatus* і *Flammulina velutipes* та ферментні препарати інтра- і екстацелюлярних пероксидаз штамів *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes* і *Lentinula edodes*. Встановлено їх ферментативну і антиоксидантну активність, вміст білку і масовий процент вмісту амінокислот у білках препаратів, який свідчить про їх кислу природу.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в 27 публікаціях – статтях у фахових виданнях [49-51, 53, 140, 143, 144, 150-153, 155, 166, 167, 174, 391, 392], патентах на корисну модель [66, 115-120] та матеріалах конференцій [48, 165, 258].



## **РОЗДІЛ 8.**

### **БІОСИНТЕЗ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ РЕЧОВИН ТА ДЕЯКИХ ПІГМЕНТІВ БАЗИДІЄВИМИ ГРИБАМИ І ПЕРСПЕКТИВИ ЇХ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ**

Серед речовин вторинного метаболізму грибів, які мають високі антиоксидантні властивості, визнане місце посідають речовини поліфенольної природи та пігменти – каротиноїди і меланіни.

Поліфенольні речовини – сполуки, що мають у складі більш ніж одну фенольну групу. Каротиноїди – натуральні пігменти, полієнові ізопреноїди терпенового ряду, які широко розповсюджені в живій природі. Меланіни представляють собою групу низькомолекулярних органічних чорних або коричневих пігментів, що утворюються при окисній полімеризації фенолів [1, 30, 78].

Ці сполуки знайшли широке застосування. Зокрема, проявляючи лікарські властивості – радіо- і фотопротекторну, імуномодельную, антиканцерогенну вони використовуються в медицині при відповідній терапії. Нормалізуючи і регулюючи основні життєві функції, вони відіграють істотну роль у формуванні стресостійкості та адаптації організмів. Продукти та лікарські препарати, багаті на ці речовини, завдяки їх доступності, м'якій дії на організм, відсутності чи порівняно низькій токсичності є найбільш перспективні для кореляції антиоксидантного статусу людського організму [263, 387].

Крім того, поліфеноли і природні пігменти знайшли широке застосування і мають високий попит у різних галузях промисловості [37-38].

В ряді досліджень показана кореляція антиоксидантної активності з вмістом фенольних сполук в грибних і рослинних екстрактах [1, 9, 27, 197, 213]. Відмічається підвищений інтерес до отримання біологічно активних добавок та створення функціональних продуктів з високим вмістом

фізіологічно активних речовин на основі поліфенольних біоантиоксидантів – високомолекулярних природних сполук, що широко містяться в грибній сировині [198, 211-213].

Пошук нових продуцентів поліфенолів, каротиноїдів та меланінів здійснюється шляхом залучення організмів нових систематичних груп. Ґрунтовне вивчення здатності до синтезу цих речовин мікологічними об'єктами почалося нещодавно. Так, вивчено вміст деяких поліфенольних речовин в плодових тілах вищих базидієвих грибів видів *Lentinula edodes*, *Inonotus obliquus*, *Phellinus robustus*, *Ganoderma applanatum*, *Fomes fomentarius* і ін. [387]. Каротино- та меланіногенез вивчено переважно у нижчих грибів, в тому числі родів *Aspergillus*, *Daldinia*, *Blakeslea*, *Ghoanephora*, *Saccharomyces* та *Phycomyces* [59, 60, 78].

Однак, наявні дані недостатньо повно характеризують кількісний вміст поліфенолів, меланінів та каротиноїдів в плодових тілах та культурах базидієвих грибів, що обумовлює необхідність подальших скринінгових робіт у цьому напрямку. Результати таких робіт дозволили б рекомендувати певні види для виділення в чисту культуру та розробки технологій їх культивування і отримання речовин фенольної природи. Крім того, фармакологічно активні речовини грибного походження, в порівнянні з продуктами хімічної синтезу, менш токсичні та більш ефективні при їх застосуванні [129, 258].

Виходячи з вищезазначеного, метою цього етапу роботи було встановлення загального вмісту, скринінг штамів базидієвих грибів – активних продуцентів поліфенолів, каротиноїдів та меланінів при їх періодичному поверхневому культивуванні на ГПС.

### 8.1. Загальний вміст поліфенольних речовин

За результатами попередніх досліджень встановлено, що біосинтез та максимальне накопичення поліфенольних (ПФ) речовин в культурах базидієвих грибів відбувається наприкінці експоненціального та у фазах сповільненого і стаціонарного росту [257]. Виходячи з цього, наприкінці терміну культивування штамів, на 12-ту добу визначали загальний вміст поліфенольних речовин у мікологічному матеріалі в перерахунку на АСБ (рис. 8.1).

Аналіз експериментальних даних показав позитивну кореляцію між вмістом поліфенольних речовин в міцелії та КФ у 95% дослідів. Також, для переважної більшості штамів характерне переважання вмісту поліфенолів в культуральній речовині над таким в міцелії. Винятком тут є штам 167 *A. cylindracea* та штам F-02 *F. velutipes*.

За реєстрованим показником у культуральному фільтраті, досліджувані штами можна розподілити на три групи.

Першу групу з найвищим вмістом поліфенольних речовин у КФ – понад 100 мг/г складають п'ять штамів: Fh-08 *F. hepatica*, T-10 *F. fomentarius*, Ls-08 *L. sulphureus*, F-03 *F. velutipes* та P-er *P. eryngii*. Другу групу складають вісім штамів з високим вмістом ПФ речовин від 80 до 100 мг/г: Gl-2 *G. lucidum*, F-202 і F-204 *F. velutipes*, P-192, P-12k, P-206 і P-94 *P. ostreatus*, Sc-10 *S. commune*. Найбільш чисельна третя група із сорока п'яти штамів порядку *Agaricales*: 167, 218, 960 *A. cylindracea*, 523 *L. edodes*, F-06, F-073, F-1, F-10, F-102, F-104, F-107, F-112, F-2, F-vv, F-610 *F. velutipes*, P-citr. *P. citrinopileatus*, D-140, Hk-35, P-004, P-01, P-035, P-039, P-081, P-082, P-083, P-087, P-088, P-089, P-105, P-107, P-191, P-203, P-208, P-209, P-210, P-6v, P-кл, P-14, P-4к, P-91, P-998, P-447, P-2175 *P. ostreatus* та порядку *Polyporales*: Dq-08 *D. quercina*, Il-4k *I. lacteus* з рівнем вмісту ПФ у КФ до 80 мг/г.

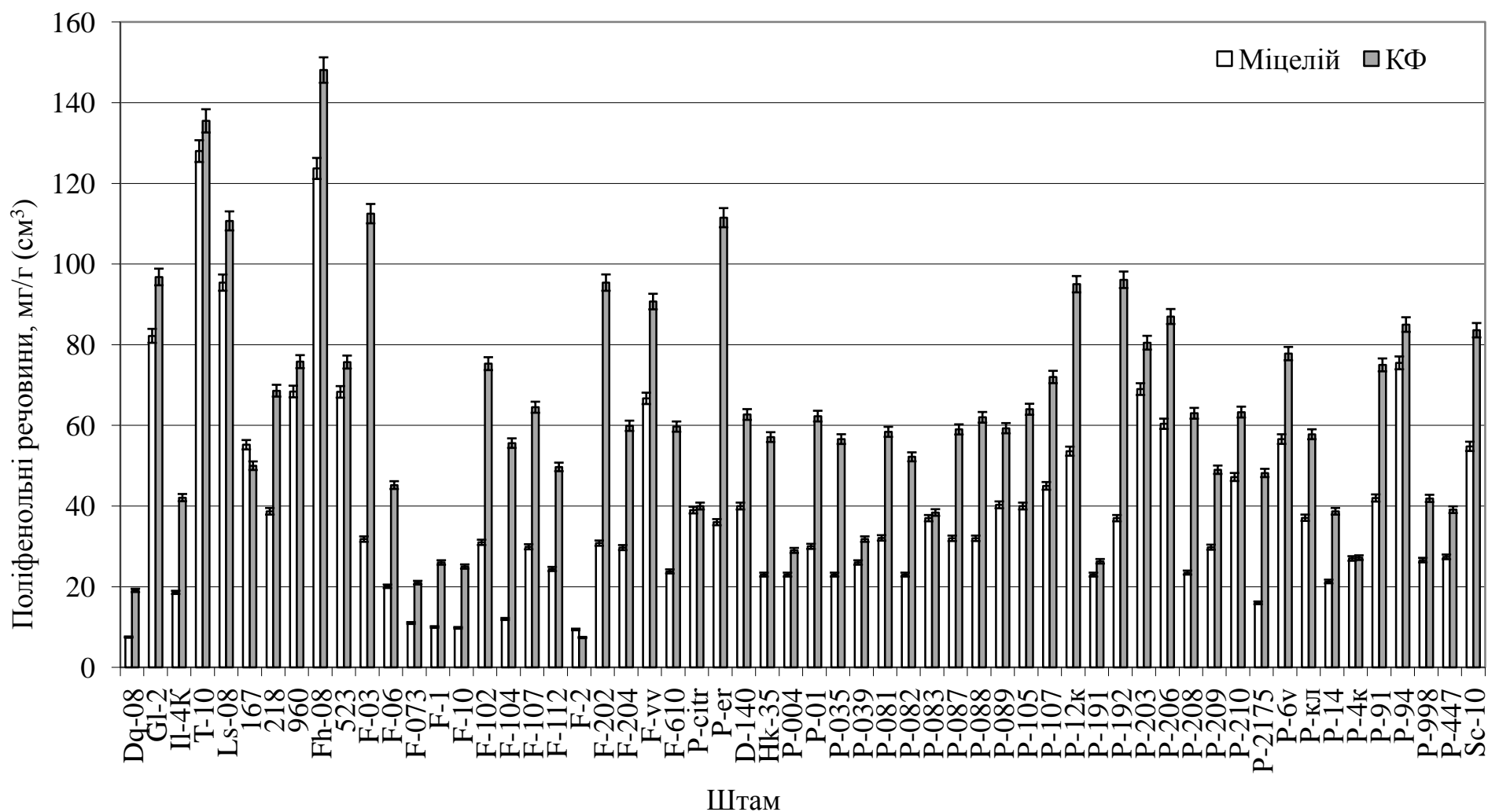


Рис. 8.1. Загальний вміст поліфенольних речовин в міцелії та КФ штамів базидієвих грибів на 12-ту (12 ДК) добу культивування

За вмістом поліфенольних речовин в міцелії, досліджувані штами також розподіляються на три групи.

До першої групи з найвищими показниками ПФ речовин міцелію – понад 80 мг/г відносяться чотири штами: T-10 *F. fomentarius*, Fh-08 *F. hepatica*, Ls-08 *L. sulphureus* та Gl-2 *G. lucidum*.

Другу групу складають дванадцять штамів з високим вмістом поліфенолів від 40 до 80 мг/г: 167, 960 *A. cylindracea*, 523 *L. edodes*, F-vv *F. velutipes*, P-107, P-203, P-206, P-210, P-6v, P-12k, P-94 *P. ostreatus* та Sc-10 *S. commune*.

Третя група – найбільш чисельна – із сорока двох штамів: порядку *Agaricales*: 218 *A. cylindracea*, F-03, F-06, F-073, F-1, F-10, F-102, F-104, F-107, F-112, F-2, F-202, F-204 і F-610 *F. velutipes*, P-citr. *P. citrinopileatus*, P-er *P. eryngii*, D-140, Hk-35, P-004, P-01, P-035, P-039, P-081, P-082, P-083, P-087, P-088, P-089, P-105, P-191, P-192, P-208, P-209, P-кл, P-14, P-4к, P-91, P-447, P-998, P-2175 *P. ostreatus* та порядку *Polyporales*: Dq-08 *D. quercina*, П-4к *I. lacteus* з рівнем вмісту ПФ у культуральному фільтраті до 40 мг/г.

Для порівняння отриманих результатів, зазначимо, що вони нижчі у відповідних міцеліальних культур (за виключенням КФ *S. commune*) порівняно з попередньо встановленим вмістом поліфенольних речовин в карпофорах цих же видів базидієвих грибів (табл. 8.1) [40, 157]. Така різниця, ймовірно, пояснюється спеціалізацією клітин плодового тіла та затребуваними захисними властивостями (індукованим біосинтезом і накопиченням) поліфенолів і пігментів в дикорослих умовах.

Отже, визначення загального вмісту поліфенольних речовин в мікологічному матеріалі при культивуванні 58 штамів базидієвих грибів дозволяє зробити наступні висновки. Встановлено, що всі досліджені штами здатні до синтезу та накопичення поліфенолів в запропонованих умовах культивування.

Таблиця 8.1

## Загальний вміст поліфенольних речовин та деяких пігментів у карпофорах видів базидієвих грибів

Вид	Кількість досліджених зразків	Поліфенольні речовини	Каротиноїди	Меланіни
		Загальний вміст, мг/ г АСБ		
1	2	3	4	5
Порядок <i>Polyporales</i>				
<i>Amyloporia lenis</i> *	3	15,05 ± 0,21	1,50 ± 0,02	0
<i>Auricularia auricula-judae</i> *	12	32,53 ± 3,52	0,85 ± 0,05	0,55 ± 0,03
<i>Chaetoporus ambiguus</i> *	6	20,66 ± 0,95	0,10 ± 0,01	0,62 ± 0,02
<i>Daedalea quercina</i> *	6	9,02 ± 0,13	0,90 ± 0,01	0
<i>Fibuloporia mollusca</i> *	6	10,54 ± 0,35	1,05 ± 0,03	0,20 ± 0,00
<i>Fomes fomentarius</i> *	12	248,29 ± 5,84	5,83 ± 0,49	44,21 ± 1,17
<i>Fomitopsis pinicola</i> *	6	39,19 ± 0,58	0,90 ± 0,41	63,24 ± 2,04
<i>Ganoderma applanatum</i> *	9	161,08 ± 0,19	55,04 ± 7,35	53,47 ± 1,03
<i>Ganoderma lucidum</i> *	15	89,06 ± 1,5	8,90 ± 0,15	4,74 ± 0,12
<i>Heterobasidion annosum</i> *	12	13,33 ± 0,64	1,33 ± 0,06	0
<i>Hydnum ochraceum</i> *	3	10,02 ± 0,24	1,00 ± 0,02	1,15 ± 0,05

Продовж. табл. 8.1

1	2	3	4	5
<i>Inonotus obliquus</i> *	12	20,55 ± 0,31	2,05 ± 0,03	83,77 ± 0,22
<i>Irpex lacteus</i> *	9	26,75 ± 0,43	2,67 ± 0,03	0,20 ± 0,01
<i>Laeticorticium roseum</i> *	3	20,02 ± 0,58	0,70 ± 0,01	1,38 ± 0,10
<i>Laetiporus sulphureus</i> *	9	117,04 ± 0,56	50,14 ± 10,74	6,28 ± 0,12
<i>Phellinus igniarius</i> *	9	34,53 ± 0,55	3,72 ± 0,76	14,24 ± 1,51
<i>Phellinus pomaceus</i> *	9	19,04 ± 0,59	1,90 ± 0,05	2,16 ± 0,04
<i>Piptoporus betulinus</i> *	12	15,10 ± 0,10	1,50 ± 0,10	1,47 ± 0,01
<i>Polyporus squamosus</i> *	9	23,20 ± 0,37	2,30 ± 0,07	2,92 ± 0,01
<i>Sparassis crispa</i> *	9	10,54 ± 0,19	0,25 ± 0,02	0,45 ± 0,05
<i>Trametes campestris</i> *	6	20,14 ± 0,41	2,01 ± 0,02	1,84 ± 0,02
<i>Trametes squalens</i> *	6	15,07 ± 0,28	1,50 ± 0,02	1,61 ± 0,01
<i>Trametes versicolor</i> *	15	14,13 ± 0,71	0,61 ± 0,11	9,45 ± 0,15
<i>Trametes zonatus</i> *	9	15,06 ± 0,52	0,64 ± 0,04	8,43 ± 0,04
<i>Tyromyces lacteus</i> *	9	16,07 ± 0,76	1,60 ± 0,02	0,26 ± 0,01
<i>Tyromyces revolutus</i> *	3	12,09 ± 0,16	1,20 ± 0,01	0,93 ± 0,01
<i>Tyromyces undosus</i> *	6	10,33 ± 0,13	1,03 ± 0,01	1,46 ± 0,01

Продовж. табл. 8.1

1	2	3	4	5
Порядок <i>Agaricales</i>				
<i>Agaricus arvensis</i> *	5	24,57 ± 4,07	2,45 ± 0,40	1,73 ± 0,05
<i>Agaricus bisporus</i> **	9	35,44 ± 0,63	4,15 ± 0,16	1,86 ± 0,08
<i>Agaricus campestris</i> *	5	23,46 ± 0,10	2,34 ± 0,01	1,00 ± 0,01
<i>Agrocybe cylindracea</i> **	9	75,85 ± 1,22	16,10 ± 0,30	1,42 ± 0,01
<i>Coprinus comatus</i> *	15	25,04 ± 0,58	2,50 ± 0,05	3,20 ± 0,01
<i>Coprinus micaceus</i> *	15	25,03 ± 0,15	2,50 ± 0,05	3,00 ± 0,01
<i>Fistulina hepatica</i> *	9	172,25 ± 0,20	40,74 ± 1,20	9,34 ± 0,17
<i>Flammulina velutipes</i> *	27	81,25 ± 7,75	25,28 ± 5,31	6,51 ± 0,13
<i>Flammulina velutipes</i> **	3	65,06 ± 0,92	6,50 ± 0,09	0,95 ± 0,01
<i>Kuehneromyces mutabilis</i> *	9	32,28 ± 0,83	4,88 ± 0,13	2,16 ± 0,09
<i>Lentinus edodes</i> **	9	35,47 ± 0,42	0,81 ± 0,08	24,67 ± 0,21
<i>Lyophyllum connatum</i> *	5	20,42 ± 0,12	2,04 ± 0,12	0,90 ± 0,02
<i>Lyophyllum loricatum</i> *	5	21,37 ± 0,63	2,13 ± 0,03	1,88 ± 0,16
<i>Marasmius oreades</i> *	3	37,08 ± 0,65	3,70 ± 0,05	0,91 ± 0,03
<i>Pholiota aurivella</i> *	3	18,02 ± 0,35	1,80 ± 0,05	0



Продовж. табл. 8.1

1	2	3	4	5
<i>Pholiota squarrosa</i> *	3	12,04 ± 0,65	1,20 ± 0,05	0
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> **	3	37,55 ± 0,11	3,75 ± 0,01	0
<i>Pleurotus eryngii</i> **	6	15,03 ± 0,42	1,50 ± 0,02	0,45 ± 0,01
<i>Pleurotus ostreatus</i> *	34	100,56 ± 3,15	0,94 ± 0,45	2,78 ± 0,09
<i>Pleurotus ostreatus</i> var. Florida **	3	53,07 ± 2,01	5,30 ± 0,01	0,30 ± 0,00
<i>Stropharia aeruginosa</i> *	3	32,53 ± 0,54	3,25 ± 0,05	1,67 ± 0,03
<i>Stropharia rugosoannulata</i> **	6	59,56 ± 1,85	5,95 ± 0,05	1,15 ± 0,02
<i>Schizophyllum commune</i> *	21	19,29 ± 0,27	0,10 ± 0,04	1,71 ± 0,12
<i>Tricholoma flavovirens</i> *	5	79,08 ± 0,20	9,35 ± 3,08	3,60 ± 1,19
<i>Tricholoma sejunctum</i> *	5	31,48 ± 0,52	3,14 ± 0,02	0,90 ± 0,01

Примітка. «\*» – дикоростуче плодове тіло, «\*\*» – комерційне плодове тіло.

Загальний вміст поліфенолів в КФ вищий за цей показник міцелію. Виявлені шість штамів з найвищим рівнем накопичення поліфенолів: у КФ та міцелію – штами Fh-08 *F. hepatica*, T-10 *F. fomentarius* та Ls-08 *L. sulphureus*; у КФ – штами F-03 *F. velutipes* та P-er *P. eryngii*; у міцелію – штам Gl-2 *G. lucidum*.

## 8.2. Загальний вміст каротиноїдів

Широке коло проблем інтенсифікації різноманітних галузей виробництва від отримання нових медичних препаратів і речовин харчового та сільськогосподарського призначення до утилізації відходів вирішується шляхом залучення до цих технологій БАР [20, 36, 121].

Одними з таких затребуваних БАР є каротиноїди. Це натуральні пігменти, полієнові ізопреноїди терпенового ряду, які широко розповсюджені в живій природі. До їх біосинтезу здатні рослини, гриби і деякі тварини та мікроорганізми [27, 60]. Для каротиноїдів виявлено низку лікарських властивостей, зокрема антиоксидантну, радіопротекторну, антиканцерогенну, імуномодуючу та інші. Згідно з даними *Business Communications Company* (BCC) світовий ринок каротиноїдів оцінюється в межах одного млрд доларів США і щорічно збільшується на 2,3%, що обумовлює актуальність пошуку нових активних продуцентів цих речовин [30, 121]. Через те, зростаючий попит на ці пігменти обумовлює пошук потенційних джерел їх отримання з розширенням номенклатури біологічних агентів, в тому числі, за рахунок грибних організмів [59, 257].

Грунтовне вивчення здатності до каротиногенезу у мікологічних об'єктів почалося нещодавно і торкається, переважно, нижчих грибів. Припускають, що близько третини представників цього царства спроможні до синтезу каротиноїдів [60]. Зокрема, поряд з традиційними джерелами отримання каротиноїдів – рослинної сировини *Haematococcus*, туніки асцидії

*Halocynthia aurantium*, використовують і біомасу пліснявих грибів *Blakeslea trispora* та *Neurospora crassa*. Досліджено вміст каротиноїдів в плодових тілах вищих базидіальних грибів родів *Hygrophorus*, *Fistulina*, *Cantharellus*, *Boletus*, *Suillus* і інших [57].

Найактивнішим продуцентом каротиноїдів є гетероталічний муковий гриб *Blakeslea trispora*. Найвищий рівень синтезу каротинів (до 3-4 г/ дм<sup>3</sup>) спостерігається за спільного вирощування (–) та (+) штамів цього гриба. Утворенню зиготи *Blakeslea trispora* передуює поява яскраво-помаранчевої смуги у місці контакту різностатевого міцелію. Взаємозв'язок статевого процесу і каротиноутворення було встановлено після виділення специфічних сполук терпеноїдної природи – триспорових кислот (А, В і С), що входять до складу статевого фактору  $\beta$  і є стимуляторами каротиногенезу [59, 81, 387].

Однак, наявні дані дають недостатньо сформоване уявлення про якісний та кількісний вміст каротиноїдів у базидіомікотових і в міцелії та культуральному фільтраті при їх культивуванні, що обумовлює необхідність подальших скринінгових робіт у цьому напрямку. Більшість базидієвих грибів у культурі невибагливі до складу живильних середовищ, є їстівними та неотруйними, що виправдовує залучення їх до мікробіологічного виробництва [21, 34].

Виходячи з вищезазначеного, метою цього етапу роботи було вивчення загального вмісту каротиноїдів у міцелії і культуральному фільтраті штамів базидієвих грибів при їх періодичному поверхневому культивуванні на ГПС.

За результатами попередніх досліджень встановлено, що біосинтез та максимальне накопичення каротиноїдів (як і поліфенолів) в культурах базидієвих грибів відбувається наприкінці експоненціального та у фазах сповільненого і стаціонарного росту [42]. Виходячи з цього, наприкінці терміну культивування штамів, на 12-ту добу визначали загальний вміст каротиноїдів у мікологічному матеріалі в перерахунку на АСБ (рис. 8.2).

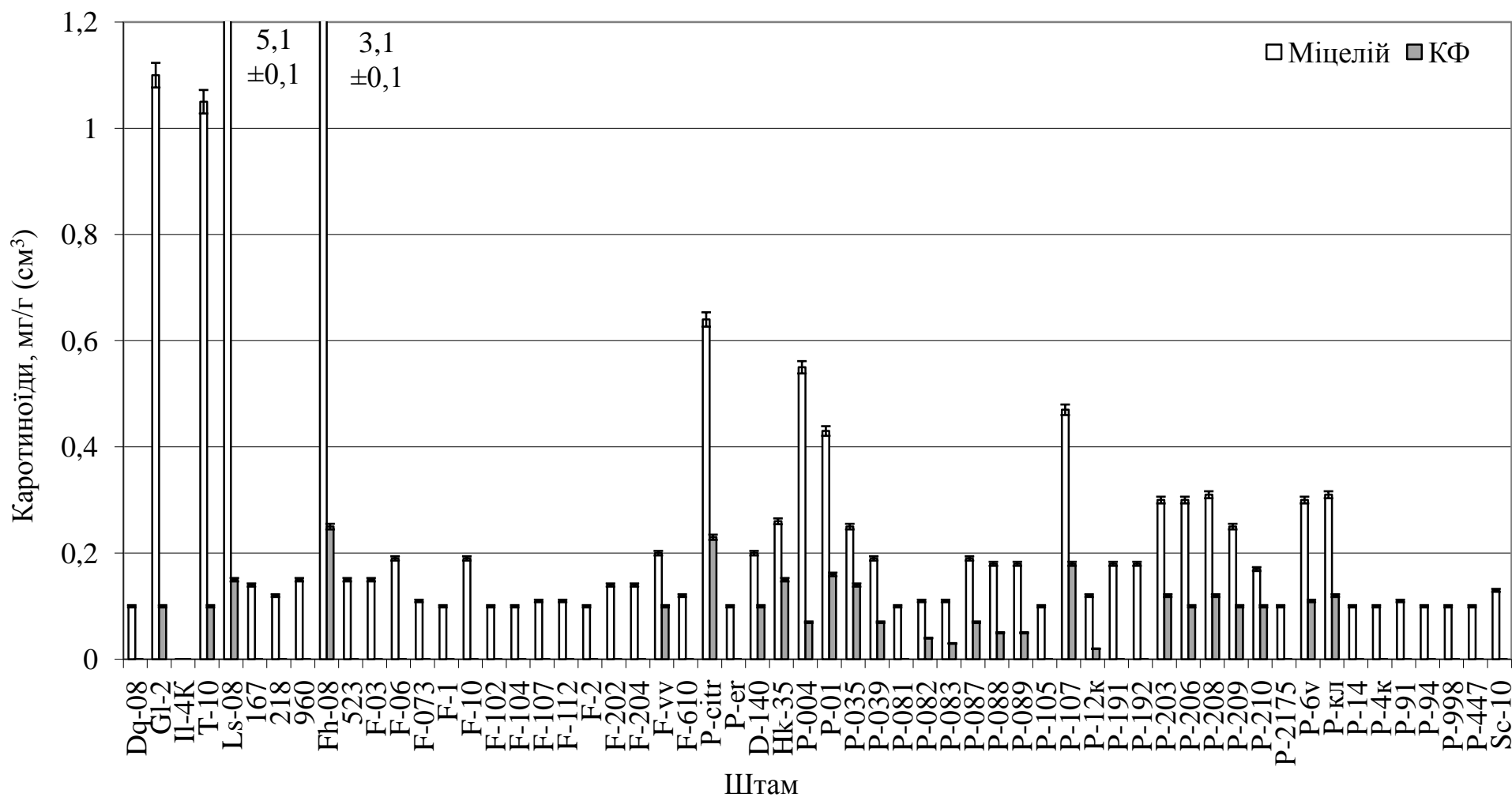


Рис. 8.2. Загальний вміст каротиноїдів в міцелії та КФ штамів базидієвих грибів на 12-ту (12 ДК) добу культивування

Встановлено, що всі штами за винятком П-4к *I. lacteus* продукують каротиноїди при культивуванні на ГПС. Загальний вміст каротиноїдів в міцелії вище такого показника культуральної рідини. Наявність каротиноїдів в КФ зафіксована у 46% дослідів, або у 26 штамів.

За реєстрованим показником у міцелії, досліджувані штами можна розподілити на три групи.

Першу групу з найвищим вмістом каротиноїдів у міцелії – понад 1 мг/г складають чотири штами: Ls-08 *L. sulphureus*, Fh-08 *F. hepatica*, Gl-2 *G. lucidum* та Dq-08 *D. quercina*.

Другу групу складають дев'ять штамів з помірним вмістом каротиноїдів від 0,3 до 1 мг/г: P-citr. *P. citrinopileatus*, P-004, P-01, P-107, P-203, P-206, P-208, P-6v і P-кл *P. ostreatus*.

До третьої групи відносяться сорок чотири штами, які незначно накопичують каротиноїди в міцелії – нижче 0,3 мг/г: 167, 218, 960 *A. cylindracea*, 523 *L. edodes*, F-03, F-06, F-073, F-1, F-10, F-102, F-104, F-107, F-112, F-2, F-202, F-204, F-vv, F-610 *F. velutipes*, P-er *P. eryngii*, D-140, Hk-35, P-035, P-039, P-081, P-082, P-083, P-087, P-088, P-089, P-105, P-12к, P-191, P-192, P-209, P-210, P-14, P-4к, P-91, P-94, P-998, P-447, P-2175 *P. ostreatus* та Sc-10 *S. commune*, T-10 *F. fomentarius*.

Як вже зазначалося, менша половина досліджених штамів виділяють каротиноїди в культуральну рідину. Їх можна розділити на дві групи.

В першу входять п'ятнадцять штамів з мінімальним вмістом каротиноїдів в КФ – до 0,1 мг/г: T-10 *F. fomentarius*, Gl-2 *G. lucidum*, F-vv *F. velutipes*, D-140, P-004, P-039, P-082, P-083, P-087, P-088, P-089, P-12к, P-206, P-209 і P-210 *P. ostreatus*.

В другу – одинадцять штамів з помірним вмістом каротиноїдів в КФ: Fh-08 *F. hepatica*, P-citr *P. citrinopileatus*, Ls-08 *L. sulphureus*, Hk-35, P-01, P-035, P-107, P-203, P-208, P-6v і P-кл *P. ostreatus*. Як вже зазначалося, менша половина досліджених штамів виділяють каротиноїди в культуральну рідину.

Їх можна розділити на дві групи.

В першу входять п'ятнадцять штамів з мінімальним вмістом каротиноїдів – до 0,1 мг/г: T-10 *F. fomentarius*, Gl-2 *G. lucidum*, F-vv *F. velutipes*, D-140, P-004, P-039, P-082, P-083, P-087, P-088, P-089, P-12к, P-206, P-209 і P-210 *P. ostreatus*.

В другу – одинадцять штамів з помірним вмістом каротиноїдів в КФ: Fh-08 *F. hepatica*, P-citr *P. citrinopileatus*, Ls-08 *L. sulphureus*, Hk-35, P-01, P-035, P-107, P-203, P-208, P-6v і P-кл *P. ostreatus*.

Таким чином, встановлення загального вмісту каротиноїдів в міцелії та КФ штамів базидієвих грибів на 12-ту добу культивування на ГПС дозволяє стверджувати наступне. Загальний вміст каротиноїдів в міцелії вище такого показника КФ. Наявність каротиноїдів в КФ зафіксована у 46% дослідів. Виявлені перспективні штами-продуценти інтрацелюлярних каротиноїдів: Ls-08 *L. sulphureus*, Fh-08 *F. hepatica*, Gl-2 *G. lucidum* і Dq-08 *D. quercina* та екстрацелюлярних каротиноїдів: Fh-08 *F. hepatica*, P-citr *P. citrinopileatus*, Ls-08 *L. sulphureus*, Hk-35, P-01, P-035, P-107, P-203, P-208, P-6v і P-кл *P. ostreatus*.

### 8.3. Загальний вміст меланінів

Одним з універсальних процесів, що протікає в клітині є перекисне окислення ліпідів – ланцюгове окиснення ненасичених жирних кислот за участю молекулярного кисню, що забезпечує розширене утворення вільних радикалів [1, 6]. Відомо, що активація цих процесів у відповідь на дію різноманітних факторів є одним з адаптаційних механізмів і спрямована на збільшення проникності клітинної мембрани, полегшення роботи мембранних білків. Однак, виходячи за певні межі, ці зрушення набувають самостійного патогенетичного значення. Рівень протікання процесів ПОЛ контролюється антиоксидантною системою організму, до якої відносяться

численні сполуки, в тому числі і меланіни [263].

Меланіни – це група високомолекулярних органічних чорних або коричневих пігментів, що утворюються при окисній полімеризації фенолів і широко розповсюджені в живій природі [27, 63, 387]. Меланіни проявляють радіо- і фотопротекторну, антиканцерогенну та іншу дію [196, 197]. Отже, вони відіграють істотну роль у формуванні стресостійкості та адаптації організмів до факторів середовища. Встановлено, що порівняно з штучно синтезованими, природні пігменти майже не токсичні та більш ефективні при застосуванні. Як наслідок, висока затребуваність та вартість меланінів зумовлює пошук потенційних джерел їх отримання, у тому числі, серед грибів [197].

Комплексне вивчення здатності до синтезу меланінів мікологічних об'єктів почалося наприкінці минулого століття і торкається, переважно, нижчих грибів родів *Aspergillus*, *Daldinia*, *Saccharomyces* та *Phycomyces* [78]. Досліджено вміст меланінів в плодових тілах вищих базидіальних грибів видів *Lentinula edodes*, *Inonotus obliquus*, *Phellinus robustus*, *Ganoderma applanatum*, *Fomes fomentarius* і інших [198]. Однак, наявні дані дають недостатньо сформоване уявлення про кількісний вміст меланінів в плодових тілах, міцелії та культуральному фільтраті базидієвих грибів, що обумовлює необхідність подальших скринінгових робіт у цьому напрямку.

Виходячи з вищезазначеного і результатів аналізу карпофорів (табл. 8.1) [40, 157], метою цього розділу роботи було визначення загального вмісту меланінів у міцелії і культуральному фільтраті штамів деяких видів базидієвих грибів при їх періодичному поверхневому культивуванні на ГПС.

За результатами попередніх досліджень встановлено, що біосинтез та максимальне накопичення вторинних метаболітів – меланінів (як каротиноїдів і поліфенолів) в культурах базидієвих грибів відбувається наприкінці експоненціального та у фазах сповільненого і стаціонарного росту [387].

Виходячи з цього, наприкінці терміну культивування штамів, на 12-ту добу визначали загальний вміст меланінів у мікологічному матеріалі в перерахунку на АСБ (рис. 8.3).

Встановлено, що більшість штамів здатні до поступового накопичення меланінів в міцелії та понад половини штамів – в культуральній рідині. Вміст меланінів в КФ значно нижчий ніж в міцелії. Це можна пояснити роллю меланінів у клітині та особливостями осмотрофного живлення грибних організмів, оскільки вони беруть участь в адаптогенних реакціях на зміни умов середовища та нейтралізації вільних радикалів [1, 8, 14]. Отже, виконуючи специфічні функції в грибному організмі, ці сполуки синтезуються та накопичуються в місцях локалізації зазначених процесів. За вмістом меланінів у міцелії, досліджувані штами можна розподілити на три групи.

До першої відносяться три культури з найвищим загальним вмістом меланінів понад 1 мг/г: T-10 *F. fomentarius*, Gl-2 *G. lucidum* з порядку *Polyporales* та F-vv *F. velutipes* з порядку *Agaricales*.

До другої групи можемо віднести п'ять штамів з помірним від 0,4 до 1 мг/г вмістом меланінів: F-202, F-204, F-102, F-06 *F. velutipes* та Ls-08 *L. sulphureus*.

Найбільш чисельна третя група з сорока восьми штамів з незначним загальним вмістом меланінів в міцелії: 167, 218, 960 *A. cylindracea*, 523 *L. edodes*, Fh-08 *F. hepatica*, F-03, F-073, F-1, F-10, F-104, F-107, F-112, F-2, F-610 *F. velutipes*, P-citr *P. citrinopileatus*, P-er *P. eryngii*, D-140, Hk-35, P-004, P-01, P-035, P-039, P-081, P-082, P-083, P-087, P-088, P-089, P-105, P-107, P-12к, P-191, P-192, P-203, P-206, P-208, P-209, P-210, P-6v, P-кл, P-14, P-4к, P-91, P-94, P-998, P-447, P-2175 *P. ostreatus* та Sc-10 *S. commune*.

Значно нижчий загальний вміст меланінів зафіксовано в культуральній рідині культивованих штамів, які можна розділити за цим показником на дві групи.



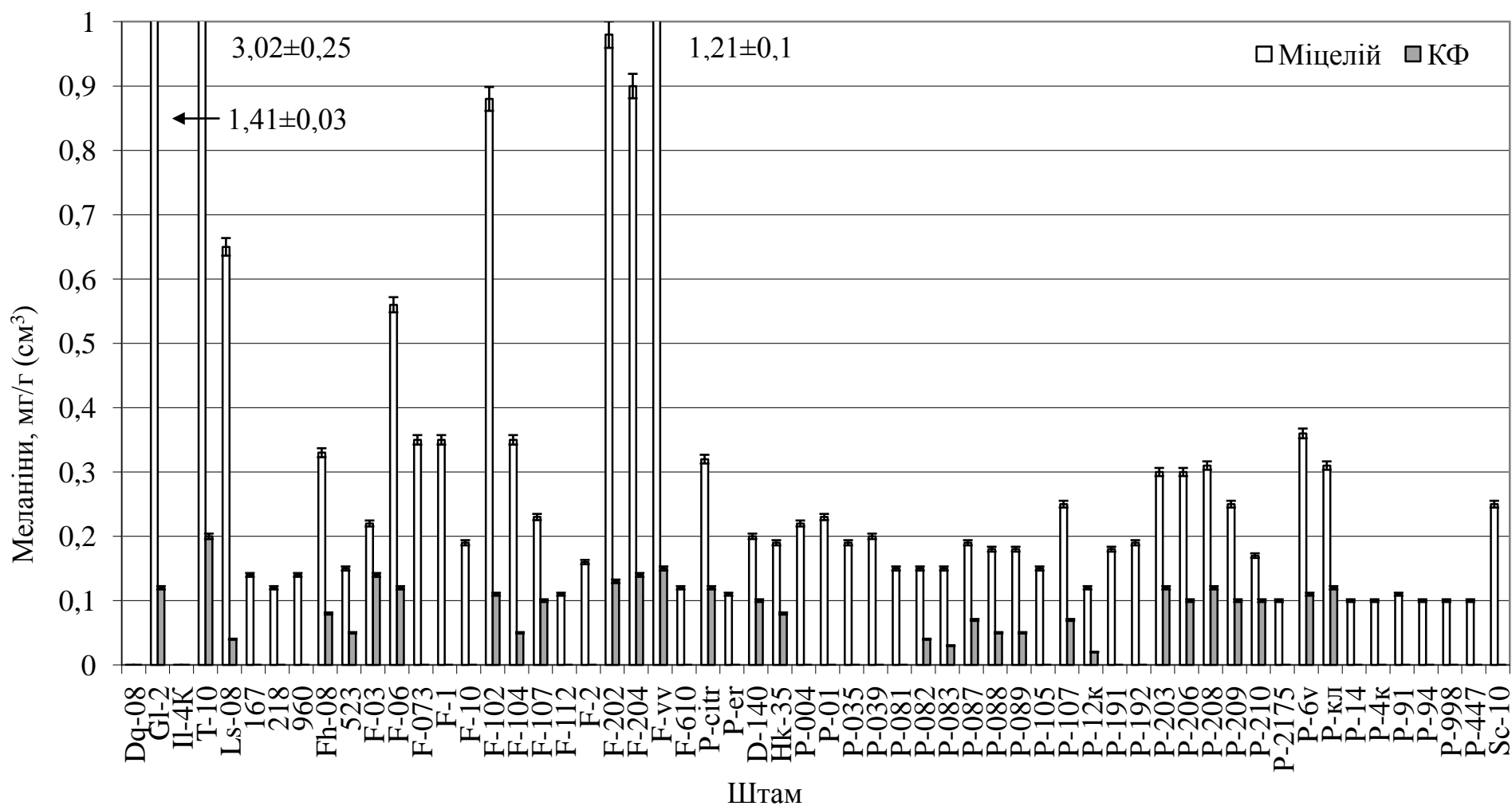


Рис. 8.3. Загальний вміст меланінів в міцелії та КФ штамів базидієвих грибів на 12-ту (12 ДК) добу культивування

До першої, з помірним загальним вмістом меланінів у КФ – понад 0,1 мг/г відносяться одинадцять штамів: Т-10 *F. fomentarius*, Gl-2 *G. lucidum*, F-03, F-vv, F-202, F-204 і F-06 *F. velutipes*, P-citr *P. citrinopileatus*, P-203, P-208 і Р-кл *P. ostreatus*.

Друга група містить вісімнадцять штамів з незначним рівнем вмісту меланінів у КФ – до 0,1 мг/г: Ls-08 *L. sulphureus*, Fh-08 *F. hepatica*, F-102, F-104 і F-107 *F. velutipes*, D-140, Hk-35, P-082, P-083, P-087, P-088, P-089, P-107, P-12к, P-206, P-209, P-210 і P-6v *P. ostreatus*.

Таким чином, вивчення вмісту меланінів в плодових тілах та культурах базидієвих грибів дозволяє стверджувати наступне. Встановлено, що переважна більшість досліджених штамів здатні до накопичення меланінів в міцелії та понад половини – в КФ, де вміст цих речовин значно нижчий за такий в міцелії. Найбільший вміст меланінів в міцелії виявлено у штамів Т-10 *F. fomentarius*, Gl-2 *G. lucidum* з порядку *Polyporales* та F-vv *F. velutipes* з порядку *Agaricales*. За результатами аналізу плодових тіл, є перспективним залучення до пошуку продуцентів меланінів штамів поліпоральних видів – *Inonotus obliquus*, *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma applanatum* і *Fomes fomentarius* та агарикальних видів – *Fistulina hepatica* і *Lentinula edodes*.

## Висновки до розділу 8

1. Встановлено, що всі досліджені штами здатні до синтезу та накопичення поліфенолів в запропонованих умовах культивування. Загальний вміст ПФ в культуральній рідині вищий за цей показник міцелію. Виявлені штами з найвищим рівнем накопичення поліфенолів: у культуральній рідині та міцелію – Fh-08 *Fistulina hepatica*, Т-10 *Fomes fomentarius* та Ls-08 *Laetiporus sulphureus*; у культуральній рідині – F-03 *Flammulina velutipes* та P-er *Pleurotus eryngii*; у міцелію – Gl-2 *Ganoderma lucidum*.

2. Доведено, що загальний вміст каротиноїдів в міцелії вище такого показника культуральної рідини. Наявність каротиноїдів в КФ зафіксована у 46% штамів. Виявлені перспективні штами-продуценти міцеліальних каротиноїдів: Ls-08 *Laetiporus sulphureus*, Fh-08 *Fistulina hepatica*, Gl-2 *Ganoderma lucidum* та Dq-08 *Daedalea quercina* та екстрацелюлярних каротиноїдів: Fh-08 *Fistulina hepatica*, P-citr *Pleurotus citrinopileatus*, Ls-08 *Laetiporus sulphureus*, Hk-35, P-01, P-035, P-107, P-203, P-208, P-6v і P-кл *Pleurotus ostreatus*.
3. Виявлено, що 97% досліджених штамів здатні до накопичення меланінів в міцелії та 52% – в культуральній рідині, де вміст цих речовин значно нижчий за такий в міцелії. Найбільший вміст меланінів в міцелії виявлено у штамів T-10 *Fomes fomentarius*, Gl-2 *Ganoderma lucidum* з порядку *Polyporales* та F-vv *Flammulina velutipes* з порядку *Agaricales*. За результатами аналізу плодових тіл, є перспективним залучення до пошуку продуцентів меланінів штамів поліпоральних видів – *Inonotus obliquus*, *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma applanatum* і *Fomes fomentarius* та агарикальних видів – *Fistulina hepatica* і *Lentinula edodes*.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в 13 публікаціях – статтях у фахових виданнях [37-43, 157, 257, 387] та матеріалах конференцій [52, 165, 258].

## Розділ 9.

# РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ СПОСОБІВ ВИКОРИСТАННЯ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БАЗИДІЄВИХ ГРИБІВ

## 9.1. Антиоксидантна активність ферментних препаратів грибного походження

Дослідження прооксидантно-антиоксидантної активності штамів базидієвих грибів показало, що біологічно активні речовини, в тому числі і антиоксиданти (наприклад, низькомолекулярна сполука – ерготіонеїн), синтезовані в клітинах міцелію, переходять у культуральний фільтрат. Можемо припустити, що ці речовини потрапляють і в грибні препарати при їх отриманні з культуральної рідини чи вегетативного міцелію.

Для перевірки цього припущення, визначали антиоксидантну активність отриманого нами 21 ферментного препарату грибного походження (табл. 9.1), різного типу активності: МЗА – молокозсідальної, ПА – пероксидазної та КА – каталазної, отримані нами для певних цілей [158, 164]. При визначенні АОА ферментних препаратів, їх концентрація у водному розчині становила 0,01 г/см<sup>3</sup>.

Як показали результати дослідження, грибні ФП суттєво відрізняються за рівнем АОА, яка вірогідно не пов'язана з вмістом в препаратах протеїнів. Також, АОА ферментних препаратів не корелює з такою активністю вихідного мікологічного матеріалу. Ймовірно, АОА культуральних фільтратів обумовлена присутністю в їх складі різних речовин (наприклад, глутатіону, проліну і ін.; взаємодії проліну з антиоксидантними ферментами до цих пір остаточно не з'ясовані) та низькомолекулярних АО речовин (наприклад, ерготіонеїн і ін.), які з різною швидкістю потрапляють в грибні препарати.

Таблиця 9.1

**Антиоксидантна активність ферментних препаратів, отриманих з міцелію (МГ) чи культурального фільтрату (КФ) деяких видів базидієвих грибів**

Вид	Штам	ФП, тип активності (походження)	Вміст білку, %	АОА, %
1	2	3	4	5
Порядок <i>Polyporales</i>				
<i>Amyloporia lenis</i>	A-004	МЗА (КФ)	43,63	56,08
<i>Chaetoporus ambiquus</i>	B-062	МЗА (КФ)	33,20	80,24
<i>Fibuloporia mollusca</i>	A-020	МЗА (КФ)	17,37	24,19
<i>Irpex lacteus</i>	B-059	МЗА (КФ)	39,11	90,80
	M-232	МЗА (КФ)	34,07	16,89
	M-253	МЗА (КФ)	33,76	86,73
<i>Laeticorticium roseum</i>	P-330	МЗА (КФ)	20,74	52,98
<i>Mycoleptodon ochraceus</i>	B-046	МЗА (КФ)	41,17	92,63
<i>Sparassis crispa</i>	B-004	МЗА (КФ)	32,50	-42,80

Продовж. табл. 9.1

1	2	3	4	5
<i>Tyromyces lacteus</i>	A-027	МЗА (КФ)	37,12	46,30
<i>Tyromyces revolutus</i>	A-025	МЗА (КФ)	36,20	39,51
<i>Tyromyces undosus</i>	M-250	МЗА (КФ)	29,60	94,78
	C-070	МЗА (КФ)	31,05	-62,85
Порядок <i>Agaricales</i>				
<i>Flammulina velutipes</i>	F-vv	КА (КФ)	55,83	19,10
	F-vv	ПА (МГ)	50,49	10,50
	F-vv	ПА (КФ)	39,63	11,00
<i>Lentinus edodes</i>	523	ПА (МГ)	39,72	5,45
	523	ПА (КФ)	20,06	14,00
<i>Pleurotus ostreatus</i>	P-01	КА (КФ)	57,07	13,85
	P-01	ПА (МГ)	37,82	6,80
	P-01	ПА (КФ)	42,41	16,50

Найвище значення АОА має ферментний препарат з штаму М-250 гриба *Tyromyces undosus*, далі йдуть за порядком убутання значень АОА штами В-046 *Mycoleptodon ochraceus*, В-059 і М-253 *Irpex lacteus*.

Для ФП штаму В-004 *Sparassis crispa* і штаму С-070 *Tyromyces undosus* зафіксована окисна активність, яка протилежна АОА і обумовлюється перевагою у їх складі речовин-окисників. Отже, і максимальні і мінімальні значення АОА зареєстровані в ФП поліпорових грибів.

ФП штамів агарикальних грибів *Flammulina velutipes*, *Lentinus edodes* та *Pleurotus ostreatus*, значно – в 5-7 разів поступаються за рівнем АОА названим штамам М-250, В-046 і В-059 поліпорових грибів. В свою чергу, ферментні препарати, отримані з міцелію мають ще меншу активність, порівняно з ФП, що виділені з культуральної рідини.

Таким чином, зареєстровані дані АОА ФП, ймовірно, відповідають не початковому загальному вмісту біоантиоксидантів (ферментів, пігментів тощо) у мікологічному матеріалі, з якого вони були виділені. Вони, скоріш за все, напряду залежать від вмісту антиоксидантів білкової природи та швидкості дифузії низькомолекулярних антиоксидантів в отримуваний препарат. Отримані дані з АОА грибних препаратів вказують на необхідність такого аналізу всієї грибної продукції для більш повної оцінки її властивостей.

## **9.2. Розробка способу біоіндикації стану довкілля з використанням показників прооксидантно-антиоксидантної системи базидієвих грибів**

Забруднення довкілля носить комплексний характер і передбачає додаткове внесення до природного рівня чи виникнення в ньому нових, зазвичай не характерних фізичних, хімічних чи біологічних факторів. Такі зміни, в переважній більшості випадків, є небажаними з негативними наслідками для живої природи. Багатофакторність забруднення посилює

задачу удосконалення існуючих та розробки нових способів тестування стану довкілля. Такі способи мають фіксувати не тільки появу і рівень тих чи інших факторів, а й виявляти в інтегральній формі ступінь і інтенсивність їх комплексного впливу на біоту. Саме цим вимогам відповідають біологічні способи індикації та моніторингу стану довкілля [138].

Розроблені способи та показана ефективність використання в якості біоіндикаторів організмів з різних систематичних груп [99, 139]. Останнім часом до цих досліджень залучаються і представники грибного царства живої природи. Зокрема, виявлено високу чутливість до змін умов середовища ксилотрофних базидіомікотових [74, 138, 139, 175].

Відомо, що індикаторні властивості біологічних об'єктів можуть проявлятися на різних рівнях організації біоти – морфологічному, ценотичному, хімічному, фізіологічному, тощо. Так, гомеостаз, фізіологічний стан та здатність до адаптації аеробних організмів визначаються сталим розвитком прооксидантно-антиоксидантного балансу – взаємодією активних форм кисню і антиоксидантів. Порушення цього балансу в бік активації процесів перекисного окислення ліпідів та зниження антиоксидантного захисту веде до розвитку певних патологічних станів, розвитку стрес-реакції на фактори довкілля і є тригером певних механізмів захисту. Швидкість утворення і накопичення прооксидантів врівноважуються на певному рівні синтезом та активністю ендо- і екзогенних антиоксидантів. Через те, для характеристики організмів чи їх станів використовується поняття антиоксидантний статус [175]. Як наслідок, цікавим є практичне використання показників прооксидантно-антиоксидантної системи організмів в багатьох галузях практичної діяльності, зокрема в індикації біотехнологічних процесів і стану довкілля.

Для оцінки екологічного стану довкілля запропоновано тест-систему [175], засновану на культивуванні конкретного тест-об'єкту у чітко визначених умовах, що відрізняються лише за одним фактором – рослинним субстратом з незабруднених та техногенно трансформованих середовищ із



подальшим визначенням і порівнянням показників стану прооксидантно-антиоксидантної системи тест-об'єкта. Це дозволяє уникнути впливу зайвих факторів середовища і дослідити відповідь тест-об'єкта на одну чи комплексну дію факторів забруднення.

Здатність рослин до біоаккумуляції екотоксикантів, зокрема, важких металів, широко відома та є основою способів фіторемедіації забруднених середовищ. На відміну від грибів, які акумулюють токсиканти переважно з субстрату, та мохів і лишайників – з атмосфери, судинні рослини здатні до накопичення елементів та відповіді на дію факторів одночасно з декількох середовищ. Таким чином, рослини відрізняються від вищезазначених організмів і виступають особливими концентраторами екотоксикантів [175]. Отже, є виправданим використання в тест-системі як рослин так і ксилотрофів. Таке поєднання дозволяє виокремити дію окремих факторів довкілля з метою спрощення інтерпретації отриманих характеристик тест-об'єкту.

Виходячи з вищезазначеного, на цьому етапі роботи проводили практичну апробацію розробленого способу використання показників прооксидантно-антиоксидантної системи культур базидіоміцетів у біоіндикації стану довкілля.

В якості тест-об'єктів використовували штами ксилотрофних базидієвих грибів: 960 *A. cylindracea*, P-er *P. eryngii*, P-089 *P. ostreatus*, Fh-08 *F. hepatica* і Sc-10 *S. commune*. Тест-штами P-089, Fh-08 і Sc-10 відібрано згідно наступних вимог: по-перше, це типові види ксилотрофів на території дослідження; по-друге, види мають різне систематичне положення; по-третє, штами добре вивчені в культурі і вирізняються високою інтенсивністю процесів ПАС як в міцелії, так і в культуральному фільтраті. Тест-штами P-er і 960 є нетиповими на території дослідження, але вже були задіяні в аналогічних випробуваннях і є цікаві для порівняння результатів біотестування за показниками  $K_{РПАС}$  [175].

Штами в контролі культивували періодично поверхнево в колбах

Ерленмеєра ємністю 250 мл на ГПС, ( $pH_0$   $6,5 \pm 0,2$ ) об'ємом 50 мл. В досліді – при тих же умовах, глюкозу ГПС було замінено на рослинний субстрат у кількості, еквівалентній за вмістом вуглецю в глюкозі. Інокулюмом ( $0,5 \pm 0,01$  г/дм<sup>3</sup>) слугували 10-ти денні міцеліальні культури штамів на СА. Термін культивування при  $27,5^\circ\text{C}$  складав 12 діб. Параметри ферментації зумовлені технологічною і економічною недоцільністю довгострокового культивування та тривалістю фази експоненціального росту штамів.

Після закінчення терміну культивування штамів, визначали та розраховували показники їх росту та ПАС.

В якості рослинного субстрату використовували листя Липи серцелистої (*Tilia cordata* Mill.), типового виду деревинних рослин в регіоні досліджень і в Україні в цілому. Листя збирали у другій частині вегетації, після завершення активного росту і до початку опаду. Для досліді обирали окремо зростаючі середньовікові рослини, що перебувають в подібних умовах за рівнем освітленості, вологості, рельєфу, ґрунтовим умовам тощо. Збір матеріалу проводили у суху погоду. Листя брали на рівні  $2 \pm 0,1$  м від ґрунту з максимальної кількості доступних гілок по всьому периметру крони (з південної, північної, східної та західної частин). Для досліджень обирали 3-4-ті листки однорічного приросту бічних гілок; одного, середнього розміру; здорові, непошкоджені, без ознак хлорозу тощо. Збір матеріалу проводили з 8-10 дерев в кожній локації для отримання середньо-змішаної проби. Свіжозібраний рослинний субстрат промивали дистильованою водою, просушували при  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ . Потім субстрат фіксували: витримували  $15 \pm 2$  хв при  $93 \pm 2^\circ\text{C}$ , при цьому інактивується переважна частина ферментів. Остаточне видалення вологи проводили у сушильній шафі при  $45 \pm 5^\circ\text{C}$  до постійної ваги сировини. Висушений субстрат перемелювали без нагріву до стану борошна, визначали вміст вуглецю і використовували в якості компоненту ГПС у досліді.

Показники стану прооксидантно-антиоксидантної системи досліджуваних культур – коефіцієнтів рівноваги ПАС ( $K_{\text{ПАС}}$ ), розраховані за

значеннями самочинної та індукованої інтенсивності процесів ПОЛ, загальної антиоксидантної активності, рівня прооксидантної активності і резерву субстратів перекисного окиснення, представлені в табл. 9.2.

В ході дослідження обирали біоіндикаційні території – рівновіддалені місця збору рослинного субстрату (локації) у м. Вінниця, які, на наш погляд, суттєво відрізняються дією забруднюючих довкілля факторів:

- локація 1 знаходилась на перехресті вул. Коцюбинського і вул. Замостянської (знаходиться територіально близько від промислових підприємств, одна з основних транспортних розв'язок);
- локація 2 – вул. Келецька і вул. Пирогова (одна з основних транспортних розв'язок міста);
- локація 3 – вул. Андрія Первозваного і вул. Юності (спальний мікрорайон міста);
- локація 4 – вул. Черняхівського і провулок Прибузький (природоохоронна зона, природний фон – ПФ).

Результати дослідження показали, що тест-об'єкти однаково добре накопичують біомасу (АСБ) на всіх модифікаціях середовища з рослинними субстратами. Вірогідної різниці за рівнем накопичення АСБ в межах штаму між локаціями не виявлено.

Аналіз показників прооксидантно-антиоксидантної системи обраних штамів ксилотрофів доводить наступне.

Рівень  $K_{\text{РПАС}}$  обраних тест-об'єктів показали вірогідну залежність фіксованих величин від місця збору рослинного субстрату. При культивуванні тест-об'єктів на модифікаціях ГПС, які містили рослинний субстрат локацій 1 і 2 (за нашою думкою, з високим техногенним навантаженням) спостерігається вірогідне збільшення показників самочинної інтенсивності процесів ПОЛ в міцелії. Це призводить до збільшення ПОА міцелію і, відповідно, зменшення незадіяних СПО. Як наслідок, розрахунок показників  $K_{\text{РПАС}}$  показує їх зменшення та зміщення рівноваги ПАС в бік прооксидації порівняно з показниками локації 4.

**Коефіцієнти рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи  
міцелію і КФ штамів базидіоміцетів у біоіндикації стану довкілля  
локацій м. Вінниця**

Локація	АСБ, г/дм <sup>3</sup>	ПФ%	К <sub>РПАС</sub>			
			Міцелій	ПФ%	КФ	ПФ%
1	2	3	4	5	6	7
Штам 960 <i>A. cylindracea</i>						
1	11,82±0,61	99	48,09±2,03 *	65	15,64±1,50 *	64
2	12,14±0,49	102	56,10±2,05 *	76	15,73±1,13 *	65
3	11,97±0,36	102	74,00±1,81	100	17,03±1,09 *	70
4 (ПФ)	11,91±0,23	100	73,79±2,98	100	24,31±1,31	100
Штам Р-er <i>P. eryngii</i>						
1	5,31±0,22	102	43,00±3,03 *	59	20,23±1,03 *	71
2	5,40±0,20	105	43,84±2,64 *	60	20,81±2,09 *	73
3	5,31±0,19	102	58,00±1,50 *	81	21,00±0,91 *	73
4 (ПФ)	5,25±0,25	100	72,48±2,19	100	28,69±0,89	100
Штам Р-089 <i>P. ostreatus</i>						
1	3,45±0,56	105	41,09±1,26 *	82	18,64±1,27 *	80
2	3,46±0,67	105	40,62±2,97 *	76	18,73±1,08 *	80
3	3,31±0,12	101	55,12±1,63	102	25,13±0,97	107
4 (ПФ)	3,29±0,09	100	53,79±2,48	100	23,31±1,61	100
Штам Fh-08 <i>F. hepatica</i>						
1	3,30±0,19	102	10,99±3,03 *	34	12,23±0,57 *	59
2	3,40±0,20	105	11,84±2,64 *	37	12,81±0,09 *	62
3	3,31±0,09	102	30,57±1,50	94	16,34±0,68 *	79
4 (ПФ)	3,25±0,15	100	32,48±1,09	100	20,69±0,87	100

1	2	3	4	5	6	7
Штам Sc-10 <i>S. commune</i>						
1	3,55±0,25	102	64,08±0,98 *	84	31,65±0,05 *	94
2	3,71±0,18	106	66,67±1,24 *	88	31,01±0,11 *	92
3	3,67±0,21	105	72,56±1,34	95	32,45±0,05	96
4 (ПФ)	3,49±0,14	100	76,12±2,61	100	33,64±2,02	100

Примітка. «\*» – різниця достовірна у порівнянні з локацією 4

Компенсаторне підвищення АОА міцелію та КФ зафіксоване для штаму Р-089 (локація 3), що може розглядатися як явище надкомпенсації та вказує на стійкість гомеостазу тест-об'єкту за даних умов ферментації. Зменшення показнику  $K_{\text{РПАС}}$  у переважній більшості випадків свідчить про відсутність компенсаторного підвищення АОА в мікологічному матеріалі та зміщення показників  $K_{\text{РПАС}}$  в бік прооксидації.

Таким чином, результати практичної апробації використання показників прооксидантно-антиоксидантної системи культур базидіоміцетів у біоіндикації стану довкілля дозволяють стверджувати наступне.

Тест-об'єкти – штами ксилотрофних базидієвих грибів 960 *A. cylindracea*, Р-ег *P. eryngii*, Р-089 *P. ostreatus*, Fh-08 *F. hepatica* і Sc-10 *S. commune* однаково добре накопичують біомасу на стандартному і модифікованому ГПС з рослинним субстратом.

Культивування тест-об'єктів на модифікованому ГПС, що містило рослинний субстрат локацій з високим техногенним навантаженням веде до вірогідного зміщення рівноваги ПАС в бік прооксидації. В запропонованому способі біотестування стану довкілля в якості тест-об'єктів можуть бути використані як типові види, так і види, які не зростають на тестованій території та показують добрі ростові показники на ГПС з рослинним субстратом.

Для штаму Р-089 зафіксоване адаптивне компенсаторне підвищення

АОА міцелію та КФ, що може обмежувати його використання в якості тест-об'єкту у зв'язку з високими захисними можливостями цієї міцеліальної культури *Pleurotus ostreatus*. Культури з компенсаторними можностями та високими біосинтетичними показниками перспективні до використання в технологіях біодеструкції та біоутилізації певних відходів промисловості і сільського господарства [163, 175].

### **9.3. Розробка способу біоконверсії лігноцелюлозних відходів з використанням базидієвих грибів – продуцентів каротиноїдів**

На сьогодні лігноцелюлозні відходи не підлягають повторному використанню, спалюються або викидаються без переробки, що є екологічно небезпечним способом утилізації. Для дереворуйнівних базидіальних грибів (ксилотрофів) характерним субстратом є деревина та різноманітні рослинні залишки, які містять лігноцелюлозу [4].

Забезпечення тваринництва надійною кормовою базою є актуальним завданням його розвитку. Збільшити кількість кормів, покращити їх якість дозволяє біоконверсія рослинних відходів шляхом збагачення білком і іншими речовинами грибного походження за рахунок розвитку на них ксилотрофів. Одним із шляхів біоконверсії таких відходів в збагачений грибними речовинами корм – мікорм (МК) є твердофазна ферментація (ТФФ) базидіоміцетів [146]. Суть твердофазної ферментації полягає у культивуванні соматичних структур міцеліальних дереворуйнівних грибів на подрібнених лігноцелюлозних субстратах.

Проводяться дослідження, спрямовані на вивчення механізмів розщеплення лігноцелюлози дереворуйнівними грибами, оскільки передбачається, що пізнання цих механізмів може відкрити шляхи для розробки екологічно чистих енергозберігаючих біотехнологій переробки деревини і різних рослинних відходів [92].

Відомі способи утилізації рослинних відходів виробництва пальмової

олії за допомогою їхньої переробки у лігноцелюлозне борошно з подальшим його використанням для одержання рідкого і твердого палива [114]. Способи розроблено для іншого виду сировини, не містять технології біоконверсії.

Проведено огляд сучасних досягнень у галузі переробки вторинної лігноцелюлозної сировини, показано перспективи використання цієї сировини в якості добрива. Наведено результати досліджень з розробки методу компостування гідролізного лігніну і тирси, оцінки якості готового продукту. В огляді не наводяться технології біоконверсії лігноцелюлозних відходів з використанням штамів базидіоміцетів.

Найбільш близьким за технічною суттю і досяжності результату є спосіб вирощування гриба глива [114]. Спосіб включає приготування і термообробку лігноцелюлозних відходів сільського господарства і лісопереробки, засів міцелію в субстрат в перфоровані пакети з прорізами. Після засіву міцелію в субстрат на перфорований пакет надягають другий пакет з мікроперфорацією діаметром 0,1-0,3 см на відстані 10-15 см на час інкубаційного періоду і при появі перших зачатків плодових тіл знімають другий пакет. Спосіб розроблено для інших видів гриба і сировини.

Виходячи з вищезазначеного, на цьому етапі роботи проводили практичну апробацію розробленого способу біоконверсії лігноцелюлозних відходів переробки олійних культур (ЛВОК: лушпиння соняшника, ріпаку тощо) шляхом твердофазної ферментації (ТФФ) базидієвого гриба *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill – продуцента каротиноїдів

Вибір ТФФ пояснюється тим, що ферментація у ферментерах відрізняється більш високими енергетичними витратами на приготування живильного середовища, аерацію, перемішування культуральної рідини, відділення та зневоднення біомаси, що є визначальними факторами собівартості кінцевого продукту, які обмежують його виробництво. Ще один фактор, що обмежує виробництво – вартість сировини, також пояснює вибір лігноцелюлозних відходів переробки олійних культур [114].

Нами обґрунтовані перспективи біотехнологічного використання

ксилотрофа *L. sulphureus*, який виявив високі біосинтетичні властивості: має вміст каротиноїдів в міцелії – до 5,13 мг/ г та у культуральному фільтраті – до 0,13 мг/ мл на 12-ту добу при культивуванні на глюкозо-пептонному середовищі [42].

Розроблений спосіб біоконверсії лігноцелюлозних відходів переробки олійних культур складається з 5 етапів.

Етап 1 – отримання суспензії посівного міцелію. Міцелій штаму Ls-08 *L. sulphureus* вирощували на сусло-агарі (СА, 4° за Баллінгом) та підтримували методом пересівів. Для отримання інокулюму, 10-ти денні міцеліальні культури на СА в об'ємі 5 мм<sup>3</sup> асептично переносили і культивували в колбах Ерленмейера ємністю 250 мл на ГПС об'ємом 100 мл стандартного складу. Вирощування посівного міцелію вели протягом 12 діб при 27,5°C і перемішуванні. Оптимальний режим культивування визначено експериментально.

Етап 2 – подрібнення і зволоження лігноцелюлозних відходів. Лігноцелюлозні відходи переробки олійних культур механічно подрібнювали до оптимальних розмірів часток субстрату 4±2 мм. Отриманий субстрат зволожували водопровідною водою у співвідношенні 1:4 вагових частин відповідно до вологості 65-75%. Така обробка забезпечує збільшення поверхні часток субстрату і кращий доступ зростаючого міцелію та екзоферментів до джерел живлення: інтенсивного руйнування, перетравлення і перетворення лігноцелюлозного субстрату у мікорм (МК).

Етап 3 – стерилізація субстрату. Лігноцелюлозний субстрат переносили у культиваційні ємності в кількості, відповідній до поставленої задачі культивування. Ємності або безпосередньо сировину поміщали в автоклав і стерилізували протягом 40-60 хв. (прямо пропорційно об'єму субстрату) при 121±2°C. При великих об'ємах можливе застосування пастеризації вологої сировини паром при 100°C протягом 1-2 год. Частки субстрату при цьому значно збільшуються за рахунок зміни внутрішньої структури.

Етап 4 – інокуляція і вирощування міцелію гриба *L. sulphureus* на



субстраті. Після стерилізації, субстрат поміщали в стерильний бокс, пасивно охолоджували і інокулювали у розрахунку 3:1 міцеліальної суспензії. Термін культивування (заростання субстрату міцелієм) становив 7-10 діб при  $27,5 \pm 2^\circ\text{C}$ . Зважали на те, що температура культивування впливає на собівартість продукту і підвищується на  $1-2^\circ\text{C}$  у середині шару субстрату. За час ТФФ субстрат наскрізь пронизувався пишним і повстьоподібним міцелієм без спороношення.

Етап 5 – підготовка готового продукту. Для подальшого зберігання та використання, отриманий продукт подрібнювали чи/або гранулювали і сушили у сухоповітряних шафах при температурі  $70 \pm 5^\circ\text{C}$ .

Аналіз даних хімічного складу лігноцелюлозних відходів переробки олійних культур і отриманого мікорму показує наступне. В МК у порівнянні з вихідним субстратом зріс вміст протеїну в 1,8-2,0 рази, в тому числі вміст протеїну, що перетравлюється – в 2,2-2,9 рази. Скоротився в 1,5-1,9 рази вміст клітковини; кількість безазотистих екстрактивних речовин (БЕР) зросла в 1,2-1,5 рази. За рахунок наявності в ГПС збільшився вміст таких важливих мікроелементів харчування, як кальцію – в 1,4-1,6 рази і фосфору – в 1,1-1,3 рази. Суттєво зріс вміст каротиноїдів в МК – від слідів до 3,5-4,1 мг/г. Разом з цим, значно зменшилася в 1,8-2,1 рази наявність рослинних олій у МК, що можна пояснити споживанням культурою гриба та значною леткістю при нагріванні субстрату [146].

Для характеристики біологічної якості, застосована методика хімічного еквіваленту – зіставлення складу незамінних амінокислот дослідного і ідеального протеїну. Використовували шкалу, яка рекомендована об'єднаним експертним комітетом ФАО/ВОЗ [250]. Амінокислота, що має мінімальний амінокислотний еквівалент, обмежує біологічну цінність протеїну. Кількісний вміст амінокислот і протеїну у субстраті та мікорму визначали за допомогою амінокислотного аналізатора, гідроліз – кислотний. S – вимоговий рівень вмісту амінокислот ідеального протеїну, C – вміст амінокислоти в протеїні зразка (табл. 9.3).

За даними дослідження, біологічна цінність протеїну досліджених зразків лігноцелюлозних відходів переробки олійних культур і мікорму суттєво різниться.

Таблиця 9.3

**Амінокислотний еквівалент протеїнів мікорму (МК) і  
лігноцелюлозних відходів переробки олійних культур (ЛВОК)**

№ з/п	Амінокислота	S, мг/ г	МК		ЛВОК	
			C <sub>1</sub> , мг/ г	C <sub>1</sub> / S × 100%	C <sub>2</sub> , мг/ г	C <sub>2</sub> / S × 100%
1.	Іле (Ile, I) *	40	38,56±1,55	96,37	22,10±2,85	55,25
2.	Лей (Leu, L) *	70	38,98±1,19	<u>55,70</u>	41,58±2,13	59,41
3.	Ліз (Lys, K) *	55	41,97±2,13	76,30	28,52±0,44	<u>51,80</u>
4.	Мет (Met, M) * + Цис (Cys, C)	35	76,33±2,18	218,0	30,60±1,34	87,42
5.	Фен (Phe, F) * + Тир (Tyr, Y)	60	96,84±1,36	161,35	38,87±1,67	64,76
6.	Тре (Thr, T) *	40	33,98±0,89	84,97	31,54±1,34	78,85
7.	Три (Trp, W) **	10	—	—	—	—
8.	Вал (Val, V) *	50	33,57±1,49	67,16	27,59±1,09	55,16
Всього:		360	360,23	—	220,80	—

Примітка. «\*» – незамінні амінокислоти, (у дужках) – аббревіатура, «\*\*» – амінокислота, вміст якої не визначали; «підкреслено» – значення мінімального амінокислотного еквіваленту, котрий обмежує біологічну цінність протеїну

Так, вміст таких незамінних амінокислот як метіонін, цистеїн, фенілаланін і тирозин значно перевищує вимоговий рівень вмісту амінокислоти в ідеальному білку, а вміст ізолейцину і треоніну впритул наближається до нього. Кількість цих амінокислот в ЛВОК тільки на 60-80%

відповідає вимогам стандарту ФАО/ ВОЗ [250]. Загальна сума амінокислот мікорму в 1,6 разу більша ніж у лігноцелюлозних відходах. Цінність протеїну мікорму обмежується вмістом лейцину і дорівнює 55,7%, чим незначно перевищує протеїн пшениці, цінність якого знаходиться в межах 53-55%. Біологічна цінність протеїну ЛВОК обмежується вмістом лізину і знаходиться на рівні 51,8%. Для цього протеїну характерна незбалансованість амінокислотного складу, що також знижує біологічну цінність.

Таким чином, запропонований спосіб біоконверсії лігноцелюлозних відходів переробки олійних культур шляхом вирощування на них штамів дереворуйнівного базидієвого гриба *Laetiporus sulphureus* [114] дозволяє переробити різні види рослинної сировини і її відходи у кормові добавки зі збільшеним вмістом цінних протеїнів і біологічно активних речовин грибного походження (зокрема, каротиноїдів), що веде до спрощення, екологізації і здешевлення виробництва.

#### **9.4. Розробка способу біодеструкції органічних сполук, що утворюються при окисленні аніліну з використанням базидієвих грибів – продуцентів пероксидаз і прооксидантних сполук**

Наявність у стічних водах певних виробництв промисловості і сільського господарства високих концентрацій хімічних забруднювачів створює значні труднощі при їх очищенні. Так, мікроорганізми активного мулу біологічних очисних споруд продуктивні в процесах переробки господарсько-побутових стоків та малоефективні при знешкодженні ксенобіотиків [92]. Через те, актуальними є розробки сучасних способів деструкції хімічно стійких сполук.

Багатообіцяючими тут є пошук і використання нових організмів (зокрема і мікологічних), що характеризуються стійкістю до дії та здатністю до деструкції ксенобіотиків [138, 139].

Високотоксичні анілінові синтетичні барвники, що застосовуються для фарбування виробів, препаратів та тканин є одним з основних типів забруднювачів у текстильній і харчовій галузях промисловості та медицині. Токсична дія цих барвників ускладнює (чи унеможлиблює при високих концентраціях) їх мікробіологічну деструкцію. Однак, дослідження показали, що анілін є субстратом пероксидази. Ензим здатний окислювати його до нітробензолу, який, в свою чергу, легко піддається подальшій повній детоксикації [92].

Базидієвий гриб *Pleurotus ostreatus* інтенсивно вивчається, є перспективним у біотехнології отримання комерційних плодових тіл і фізіологічно активних речовин. Скринінгові дослідження показали можливість використання штаму P-01 *P. ostreatus* як високоактивного продуцента екстра- і інтрацелюлярних пероксидаз у біотехнології отримання ферменту пероксидази мікологічного походження.

Останнім часом активно патентуються розробки щодо використання біологічних агентів для очистки об'єктів довкілля та деструкції ксенобіотиків. Так, відомий спосіб біологічного очищення стічних вод від фенолу. Очищення здійснюють шляхом спільного і одночасного окиснення фенолів активним мулом та перексидом водню. Апробовано спосіб очищення стічних вод від барвників та/або органічних речовин, що містять сульфогрупи. Стічні води обробляють при рН 9,5-11,5 водорозчинною сіллю двох- або тривалентного металу в масовому співвідношенні з інгредієнтами 4:1 – 15:1, нейтралізують до рН 6,5-8,5 та піддають механічному очищенню з подальшим ультрафільтраційним розділенням. Розроблено спосіб очищення об'єктів довкілля від нафтопродуктів. Використовуються нові штами бактерій – деструкторів нафтопродуктів, здатних рости в широкому діапазоні температур і рН середовища, а також при підвищених температурах на середовищах, що містять в якості джерела вуглецю n-парафіни широкої фракції, дизельне паливо, сиру нафту, мазут, масла, ароматичні вуглеводні. Штами можуть бути використані для очищення від нафтозабруднень різних

емностей, водних поверхонь, ґрунтів, стічних вод нафтопереробної, металургійної, машинобудівної, харчової промисловості, при виробництві мила, фарб, парфумерно-косметичних засобів. Сутність застосування: отримання біопрепаратів на основі штамів *Acinetobacter valentis subspecies paraffinicum*; МКПМ-В-6727 Н-1; МКПМ-В-6728 G-1; МКПМ-В-6726 С-2, зростаючих при температурі 10–50°C, в широкому діапазоні рН 5,5–8,5 при швидкості потоку середовища  $D = 0,25\text{--}0,33 \text{ год}^{-1}$ .

В основу цього етапу роботи поставлено завдання розробки і апробації в лабораторних умовах способу деструкції анілінового барвника (С.І. 27950) з використанням високоактивного штаму Р-01 *P. ostreatus*, який є новим за організмом-деструктором, дешевим та доступним за технологією при використанні в очисних спорудах промислових підприємств, відходи яких містять цей барвник.

Розроблений спосіб біодеструкції органічних сполук, що утворюються при окисленні аніліну включає 3 етапи.

Етап 1 – культивування штаму-деструктору на стандартному середовищі. Штам Р-01 *P. ostreatus* культивували на ГПС в стандартних умовах, де співвідношення С:N дорівнює 13:1. В якості інокулюму використовували 10-ти денні міцеліальні культури штаму Р-01 на СА.

Етап 2 – культивування штаму-деструктору на середовищі з різними концентраціями анілінового барвника. Відомо, що стічні води текстильної промисловості містять аніліновий барвник (С.І. 27950) у концентрації  $0,2865 \pm 0,01 \text{ г/дм}^3$ . Виходячи з цього, до стандартного ГПС додавали аніліновий барвник (С.І. 27950) у концентраціях: 0,2865; а також 0,1433; 0,0573 та 0,0287 г/дм<sup>3</sup>, досягаючи розведення основної концентрації у 2, 5 та 10 разів. Далі, на отриманих модифікаціях ГПС культивували штам Р-01 *P. ostreatus*. Термін у 12 діб та температура ферментації 27,5°C обрано виходячи з результатів попередніх досліджень, в яких виявлено, що максимуми ПА припадають на період експоненціального росту штаму Р-01.

Наприкінці терміну культивування визначали пероксидазну активність

у міцелії та культуральному фільтраті, накопичення АСБ і показник ступеня деструкції анілінового барвника (табл. 9.4). Зазначається концентрація полютанту, накопичення АСБ, вихідне ( $pH_0$ ) та наприкінці ( $pH_{12}$ ) ферментації рН культуральної рідини, рівень питомої ПА та ефективність знебарвлення барвнику.

Таблиця 9.4

**Пероксидазна активність та ефективність знебарвлення  
анілінового барвнику (С.І. 27950) штамом Р-01 *P. ostreatus***

Концентрація анілінового барвнику, г/дм <sup>3</sup>	$pH_0$	$pH_{12}$	АСБ, г/ дм <sup>3</sup>	ПА <sub>ПТ</sub> , од/мг 10 <sup>-2</sup>		Е <sub>зн.</sub> , %
				Міцелій	КФ	
0,2865	6,52	6,95*	2,68 ±0,07*	1,25 ±0,05*	1,06 ±0,12	38,35 ±1,02
0,1433	6,50	6,68*	3,20 ±0,09*	1,38 ±0,15*	1,85 ±0,30*	50,10 ±0,85
0,0573	6,50	6,35*	3,20 ±0,05*	1,00 ±0,11*	1,50 ±0,01*	60,78 ±1,04
0,0287	6,48	6,26	3,50 ±0,05	1,00 ±0,05*	1,27 ±0,03*	85,80 ±1,05
0 (контроль)	6,50	6,20	3,55 ±0,02	0,44 ±0,02	0,92 ±0,06	—

Примітка. «\*» – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Дослід показав, що аніліновий барвник у всіх концентраціях пригнічує швидкість накопичення біомаси штамом Р-01 *P. ostreatus*. Виключенням є концентрація 0,0287 г/ дм<sup>3</sup>, при якій АСБ вірогідно не відрізняється від контролю.

Пероксидазна активність міцелію, порівняно з контролем, вірогідно

підвищується за дії анілінового барвнику при всіх концентраціях. Максимальний рівень ПА<sub>ПТ</sub> міцелію та культурального фільтрату зафіксовано при концентрації 0,1433 г/дм<sup>3</sup>.

Ефективність знебарвлення анілінового барвнику (С.І. 27950) є максимальною при найнижчій концентрації барвнику у середовищі. З підвищенням концентрації спостерігається зниження ефективності знебарвлення, що узгоджується з ростовими показниками.

На етапі 3 вивчали деструкцію анілінового барвнику (С.І. 27950) у водному розчині за умови додавання міцелію штаму Р-01 *P. ostreatus* (табл. 9.5).

Таблиця 9.5

**Ефективність знебарвлення анілінового барвнику (С.І. 27950) у концентрації 0,0287 г/дм<sup>3</sup> міцелієм штаму Р-01 в залежності від часу експозиції міцелію**

Експозиція, годин	Кількість міцелію (АСБ), г/дм <sup>3</sup>				
	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
	Езн., %				
24	19,50	25,24	35,50	45,12	58,90
	± 0,50	± 0,62	± 0,95	± 1,01	± 1,30
48	23,45	34,88	46,85	55,20	68,56
	± 0,25	± 0,81	± 0,25	± 1,05	± 1,30
72	30,00	45,20	50,09	66,56	75,90
	± 1,01	± 0,80	± 1,03	± 1,03	± 1,45

Готували водний розчин анілінового барвнику (С.І. 27950) у концентрації 0,0287 г/дм<sup>3</sup> – концентрація відповідає найвищому рівню ефективності знебарвлення. До розчину вносили вітальний міцелій штаму Р-01 *P. ostreatus* в кількості 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 та 3,0 г/дм<sup>3</sup> в перерахунку на АСБ. Суміш інкубували протягом 1, 2 та 3 діб в стандартних умовах. Наприкінці культивування визначали ефективність знебарвлення барвнику.

Вивчення ефективності знебарвлення водного розчину анілінового барвнику (С.І. 27950) у концентрації  $0,0287 \text{ г/дм}^3$  при внесенні міцелію штаму Р-01 *P. ostreatus*, показало наступне. Спостерігається поступове збільшення показника  $E_{\text{зн}}$  разом зі збільшенням як часу експозиції так і кількості внесенного міцелію. Максимальна ефективність знебарвлення – 75,9% – відповідає максимальній дії чинників.

Таким чином, запропонований спосіб деструкції анілінового барвнику (С.І. 27950) з використанням штаму Р-01 *P. ostreatus* є новим за організмом-деструктором, дешевим та доступним за технологією при використанні в очисних спорудах промислових підприємств, відходи яких містять органічні сполуки – окислений анілін. Застосований у способі вид базидієвого гриба є типовим, широко розповсюдженим їстівним, що унеможливорює мікробіологічне забруднення довкілля.

## Висновки до розділу 9

Напіввиробничі і виробничі випробування способів практичного використання прооксидантно-антиоксидантної системи інтродукованих штамів базидієвих грибів в біотехнології: отримання оксидоредуктаз, встановлення антиоксидантної активності ферментних препаратів, біоконверсія лігноцелюлозних відходів з використанням штамів – продуцентів каротиноїдів, біодеструкція органічних сполук-похідних аніліну і інші переконливо показали ефективність пропонованих методів і підходів, які забезпечують отримання продукції нової якості, діагностику і інтенсифікацію біотехнологічного виробництва.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в 10 публікаціях – статтях у фахових виданнях [142, 146, 149, 158, 163, 164, 169, 175, 256] та патенті на корисну модель [114].



## ВИСНОВКИ

У дисертації представлені та проаналізовані нові дані комплексного вивчення прооксидантно-антиоксидантної системи 58 штамів, що належать до 13 видів порядків *Polyporales* та *Agaricales* відділу *Basidiomycota*; здійснені дослідження широкого спектру їх біохімічних показників, що відображають зміни у процесах синтезу фізіологічно активних сполук (прооксидантів, антиоксидантів, оксидоредуктаз, каротиноїдів тощо) під впливом факторів культивування; висунуті теоретичні положення та експериментально доведені можливості індукції або/чи гальмування певних прооксидантно-антиоксидантних процесів; зроблені на їх основі обґрунтування доцільності використання показників і продуктів перекисного окислення ліпідів та антиоксидантного захисту цих організмів; вперше розроблені біотехнології використання прооксидантно-антиоксидантної системи (перекисного окислення ліпідів, прооксидантно-антиоксидантної і оксидоредуктазної активності, утворення пігментів) базидієвих грибів.

1. Виявлені групи штамів базидієвих грибів за рівнем інтенсивності процесів перекисного окислення ліпідів. Встановлено, що самочинна та індукована інтенсивність процесів ПОЛ в міцелії всіх досліджених штамів вища за цей показник в культуральному фільтраті. Інтенсивність процесів ПОЛ як міцелію, так і культурального фільтрату змінюється під впливом факторів чи наростає з часом культивування, що пояснюється зростаючою нестачею певних живильних речовин (перш за все вуглецевмісних) та збільшенням кількості і концентрації продуктів метаболізму в середовищі. А отже, показник інтенсивності процесів ПОЛ може бути використаний для індикації біотехнологічних і екологічних процесів.
2. Доведено, що співвідношення значень індукованої та самочинної інтенсивності процесів ПОЛ є індивідуальним для кожного штаму і не залежить від його систематичного положення. Зміщення рівноваги

самочинне-індуковане ПОЛ відносно самочинного (стаціонарного) рівня є ознакою розвитку стрес-реакції. При цьому продукти ПОЛ можуть бути як індукторами, так і первинними медіаторами стресу як особливого стану біологічної системи.

3. Встановлено, що найпродуктивніші штами базидієвих грибів за рівнем загальної антиоксидантної активності міцелію можна представити у вигляді послідовності: P-er *Pleurotus eryngii* > P-citr *Pleurotus citrinopileatus* > P-035 *Pleurotus ostreatus* > Fh-08 *Fistulina hepatica* > 960 *Agrocybe cylindracea* > 523 *Lentinula edodes*; а культурального фільтрату – P-081 > P-082 > P-087 *Pleurotus ostreatus* > P-citr *Pleurotus citrinopileatus*. Вищезазначені штами рекомендовано в якості продуцентів антиоксидантів. Залежності між реєстрованими показниками накопичення біомаси та антиоксидантної активності досліджених культур грибів не виявлено.
4. Виявлено, що для досліджених штамів характерне значне переважання активності прооксидантної складової ПАС в культуральному фільтраті порівняно з цим показником міцелію. Найвищі значення прооксидантної активності КФ відмічаються на 12-ту добу культивування штамів P-089 *Pleurotus ostreatus* і Gl-2 *Ganoderma lucidum*, а міцелію – P-citr, P-089, P-er та P-082 роду *Pleurotus*. Є пряма залежність між показниками ПОА КФ і міцелію кожного штаму, ця залежність та рівень показника не відображають їх систематичного положення. Штами з високим рівнем прооксидантної активності, на прикладі деструкції анілінового барвника, запропоновано використовувати в біотехнологіях деструкції хімічно стійких сполук.
5. Виявлена суттєва перевага показників резерву субстратів перекисного окислення міцелію більшості штамів над таким показником КФ. Найвищі значення резерву СПО міцелію зафіксовані для штамів P-447, P-998, P-039, P-94, P-2175, P-citr, P-er, D-140 роду *Pleurotus* та штамів F-107, F-610 роду *Flammulina*. Вищезазначені штами мають резерв індукції

ПОЛ та здатні до індикації зміни факторів середовища.

6. Встановлено, що для значної більшості штамів характерне переважання значень коефіцієнтів рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи міцелію над такими КФ. Максимальні значення коефіцієнтів рівноваги ПАС 9-ти добового міцелію зафіксовані для штамів Т-10 *Fomes fomentarius* і D-140, P-035, P-01, P-105 *Pleurotus ostreatus* та 12-ти добового – штамів Sc-10 *Schizophyllum commune*, P-кл, P-14 *Pleurotus ostreatus*, P-er *Pleurotus eryngii* і 960 *Agrocybe cylindracea*. Названі штами вирізняються високим рівнем АОА міцелію на встановлену добу культивування і можуть бути рекомендовані як продуценти антиоксидантів міцеліального походження.
7. Встановлено каталазну та пероксидазну активності штамів базидієвих грибів. Відібрані перспективні штами: Т-10 *Fomes fomentarius*, F-2 і F-vv *Flammulina velutipes* – продуценти інтрацелюлярних каталаз; P-208, P-01 *Pleurotus ostreatus*, F-vv *Flammulina velutipes*, P-citr *Pleurotus citrinopileatus* – екстрацелюлярних каталаз; 167 *Agrocybe cylindracea*, P-кл *Pleurotus ostreatus* – продуценти інтрацелюлярних пероксидаз та 960, 218 *Agrocybe cylindracea*, 523 *Lentinula edodes* та P-кл, P-01 *Pleurotus ostreatus* – екстрацелюлярних пероксидаз.
8. Вперше показана можливість регуляції (індукції чи репресії) показників прооксидантно-антиоксидантної системи базидієвих грибів на прикладі штамів P-er *Pleurotus eryngii*, Fh-08 *Fistulina hepatica* та 960 *Agrocybe cylindracea* шляхом несення до культуральної рідини таніну, лігносульфонату натрію, галової кислоти і перекису водню.
9. На основі удосконалення складу живильного середовища та способу отримання, вперше виділені грибні ферментні препарати інтрацелюлярних каталаз штамів *Pleurotus ostreatus* і *Flammulina velutipes* та ферментні препарати інтра- і екстрацелюлярних пероксидаз штамів *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes* і *Lentinula edodes*. Встановлено їх ферментативну і антиоксидантну активність, вміст білку

і масовий процент вмісту амінокислот у білках препаратів, який свідчить про їх кислу природу.

10. Встановлено, що всі досліджені штами здатні до синтезу та накопичення поліфенолів в запропонованих умовах культивування. Загальний вміст ПФ в культуральній рідині вищий за цей показник міцелію. Виявлені штами з найвищим рівнем накопичення поліфенолів: у культуральній рідині та міцелію – Fh-08 *Fistulina hepatica*, T-10 *Fomes fomentarius* та Ls-08 *Laetiporus sulphureus*; у культуральній рідині – F-03 *Flammulina velutipes* та P-er *Pleurotus eryngii*; у міцелію – Gl-2 *Ganoderma lucidum*.
11. Доведено, що загальний вміст каротиноїдів в міцелії вище такого показника культуральної рідини. Наявність каротиноїдів в КФ зафіксована у 46% штамів. Виявлені перспективні штами-продуценти міцеліальних каротиноїдів: Ls-08 *Laetiporus sulphureus*, Fh-08 *Fistulina hepatica*, Gl-2 *Ganoderma lucidum* та Dq-08 *Daedalea quercina* та екстрацелюлярних каротиноїдів: Fh-08 *Fistulina hepatica*, P-citr *Pleurotus citrinopileatus*, Ls-08 *Laetiporus sulphureus*, Hk-35, P-01, P-035, P-107, P-203, P-208, P-6v і P-кл *Pleurotus ostreatus*.
12. Виявлено, що 97% досліджених штамів здатні до накопичення меланінів в міцелії та 52% – в культуральній рідині, де вміст цих речовин значно нижчий за такий в міцелії. Найбільший вміст меланінів в міцелії виявлено у штамів T-10 *Fomes fomentarius*, Gl-2 *Ganoderma lucidum* з порядку *Polyporales* та F-vv *Flammulina velutipes* з порядку *Agaricales*. За результатами аналізу плодових тіл, є перспективним залучення до пошуку продуцентів меланінів штамів поліпоральних видів – *Inonotus obliquus*, *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma applanatum* і *Fomes fomentarius* та агарикальних видів – *Fistulina hepatica* і *Lentinula edodes*.
13. Вперше розроблені та опрацьовані способи практичного використання прооксидантно-антиоксидантної активності базидієвих грибів в біотехнології: отримані оксидоредуктази і рекомендовані продуценти антиоксидантів, проведена біоконверсія лігноцелюлозних відходів з

використанням штамів – продуцентів каротиноїдів, біодеструкція органічних сполук – похідних аніліну і інші.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аверьянов А.А. Влияние меланина на цитотоксичность кислородных радикалов / А.А. Аверьянов, В.П. Лапикова, Г.Г. Петелина, В.Г. Джавахия, А.М. Умнов, М.В. Стекольников // Биохимия. – 1987. – Т. 52. № 9. – С. 1539–1546.
2. Адлер Ю.П. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий / Ю.П. Адлер, Е.В. Маркова, Ю.В. Грановский. – М.: Наука, 1976. – 170 с.
3. Андреева Л.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – №11. – С. 41–43.
4. Антоняк Г.Л. Екологія грибів / Г.Л. Антоняк, З.І. Калинець-Мамчур, І.О. Дудка, Н.О. Бабич, Н.Є. Панас. – Львів, 2013. – 628 с.
5. Артемов А.В. Перспективы использования ферментативного катализа в текстильной промышленности / А.В. Артемов, В.О. Попов, О.В. Королева, Е.В. Шубина, Т.Н. Кудрявцева // Катализ в промышленности. – 2006, – № 1. – С. 42-47.
6. Атыкян Н.А. Влияние концентрации фенола на рост и синтез окислительных ферментов грибом *Lentinus tigrinus* и бактерией *Rhodococcus erythropolis* при отдельном и совместном культивировании / Н.А. Атыкян, Е.Г. Костина, В.В. Ревин // Современная микология в России: Второй съезд микологов России: тез. докл. – М., 2008. – Т. 2. – С. 117–118.
7. Ауце А.А. Применение пероксидазы для утилизации фенолсодержащих отходов биохимических производств / А.А. Ауце, И.И. Брад, В.Э. Зариня // Методы получения, анализа и применения ферментов: тез. Всес. конф. – Рига, 1990. – С. 199.
8. Бабицкая В.Г. Антиоксидантная активность грибов – деструкторов лигноцеллюлозных субстратов / В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба //

- Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38, № 2. – С. 169–173.
9. Бабицкая В.Г. Физиологически активные соединения плодовых тел ксилотрофных базидиомицетов / В.Г. Бабицкая, В.В. Трухоновец, Д.А. Смирнов, В.В. Щерба, О.В. Осадчая, Т.В. Филимонова, Т.В. Черноок // Современная микология в России: Второй съезд микологов России: тез. докл. – М., 2008. – Т. 2. – С. 118–119.
  10. Бадалян С.М. Иммуномодулирующая и противоопухолевая активность макроскопических грибов (*Basidiomycotina*) / С.М. Бадалян // Проблемы медицинской микологии. – 2000. – Т. 2, № 1. – С. 23–28.
  11. Бадалян С.М. Исследование антиоксидантной активности некоторых базидиальных макромицетов / С.М. Бадалян, А.В. Гаспарян, Н.Г. Гарибян // Микология и фитопатология. – 2003. – Т. 37, вып. 5. – С. 63–68.
  12. Бадалян С.М. Основные группы терапевтически значимых метаболитов медицинских грибов / С.М. Бадалян // Проблемы медицинской микологии. – 2001. – Т. 3, № 1. – С. 25–32.
  13. Барабой В.А. Корекція променевих уражень, спричинених низько інтенсивним опроміненням, за допомогою АО / В.А. Барабой, Н.О. Горчакова, С.А. Олійник, Ю.В. Хмелевський // Український біохімічний журнал. – 1994. – Т. 66, № 6. – С. 3–22.
  14. Бекер М.Е. Введение в биотехнологию / М.Е. Бекер – М.: Пищевая промышленность, 1978. – 231 с.
  15. Белова Н.В. Грибы белой гнили древесины и возможность их использования для утилизации отходов / Н.В. Белова, Н.П. Денисова // Биотехнология. – 2005. – № 4. – С. 55–58.
  16. Белова Н.В. Современные направления исследования и методы анализа макромицетов / Н.В. Белова // Современная микология в

- России: Второй съезд микологов России: тез. докл. – М., 2008. – Т. 2. – С. 107–108.
17. Белозерская Т.А. Активные формы кислорода и стратегия антиоксидантной защиты у грибов / Т.А. Белозерская, Н.Н. Гесслер // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – 43, № 5. – С. 565–575.
  18. Билай В.И. Основы общей микологии / В.И. Билай. – К.: Вища школа, 1980. – 360 с.
  19. Биленко М.В. Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии / М.В. Биленко // Медицина. – 1982. – Т. 6. № 2. – С. 195–213.
  20. Биотехнология: Учеб. пособие для вузов: [В 8 кн.] / Под ред. Н.С. Егорова. – Кн. 8: Инженерная энзимология. – М.: Высш. шк., 1987. – 147 с.
  21. Бисько Н.А. Биология и культивирование съедобных грибов рода Вешенка / Н.А. Бисько, И.А. Дудка – К.: Наук. думка, 1987. – 147 с.
  22. Бисько Н.А. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре / Н.А. Бисько, А.С. Бухало, С.П. Вассер. Под ред. И.А. Дудки. – Киев: Наук. думка, 1983. – 312 с.
  23. Бисько Н.А. Изучение биологического разнообразия штаммов для совершенствования биотехнологии производства ценного съедобного лекарственного гриба шиитаке (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.) / Н.А. Бисько, Н.Ю. Митропольская // Мат–лы Междунар. конф. "Проблемы микробиологии и биотехнологии". – Минск, 1998 а. – С. 108.
  24. Бисько Н.А. Лекарственные грибы для здоровья и красоты / Бисько Н.А., Митропольская Н.Ю., Соломко Э.Ф. – Киев, 2003. – 40 с. (Препринт / НАН Украины, Ин-т ботаники им. М.Г. Холодного)
  25. Бисько Н.А. Скрининг высокопродуктивных штаммов *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., перспективных для биотехнологического использования / Н.А. Бисько, В.И. Фомина, Н.Ю. Митропольская // Микробиология



и биотехнология XXI столетия: междунар. конф., 22–24 мая 2002 г.: тезисы докл. – Минск, 2002. – С. 9-12.

26. Бисько Н.А. Физиологические и медико–биологические аспекты исследований съедобного лекарственного гриба шиитаке *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. / Н.А. Бисько, Н.Ю. Митропольская // Первый съезд микологов России. Тезисы докл. – М.: Национальная академия микологии, 2002 а. – С. 277.
27. Блажей А. Фенольные соединения растительного происхождения / А. Блажей, Л. Шутый. – М.: Мир, 1977. – 240 с.
28. Борисова В.Н. Метаболиты почвенных микромицетов. Пероксидазы у грибов / Борисова В.Н. – К.: Наук. думка, 1971. – С. 70–81.
29. Борисова В.Н. Пероксидазы гифомицетов / В.Н. Борисова, Р.Г. Дехтярь, Л.В. Гудкова, Л.М. Здоровец // Мицелиальные грибы (физиология, биохимия, биотехнология: тез. докл. Всесоюз. науч.-техн. конф. – Пушино, 1983. – С. 134.
30. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов / Г. Бриттон. – М.: Мир, 1986. – 424 с.
31. Бурлакова Е.Б. Изучение аддитивного антиокислительного действия суммы природных антиоксидантов липидов / Е.Б. Бурлакова, Н.М. Сторожок, Н.Г. Храпова // Вопросы медицинской химии. – 1990. – Т. 36, вып. 4. – С. 72–74.
32. Бурлакова Е.Б. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты / Е.Б. Бурлакова, Н.Г. Храпова // Успехи химии. – 1985. – Т. 54, № 9. – С. 1540–1558.
33. Бухало А.С. Дослідження культур їстівних та лікарських шапинкових грибів / А.С. Бухало, Н.А. Бисько, Е.Ф. Соломко, Н.Ю. Митропольська, В.Т. Білай, Н.Л. Поединок // Мат–ли XI з'їзду Укр. бот. тов–ва: тези допов. – Х., – 2001. – С. 55–56.
34. Бухало А.С. Культивирование съедобных и лекарственных грибов : Практ. реком. / А.С. Бухало, Н.А. Бисько, Э.Ф. Соломко, В.Т. Билай,

- Н.Ю. Митропольская, Н.Л. Поединок, А.А. Гродзинская, О.Б. Михайлова – К., 2004. – 120 с.
35. Бухало А.С. Лекарственные препараты и пищевые добавки из макромицетов / А.С. Бухало, Э.Ф. Соломко, С.П. Вассер, О.Б. Михайлова // Успехи медицинской микологии. – М.: Нац. акад. Микологии. – 2005. – Т. 5. – С. 254–256.
  36. Буценко Л.М. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Навч. посіб./ Л.М. Буценко, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог. – К.: НУХТ, – 2010. – 323 с.
  37. Велигодська А.К. Вплив джерел азотного живлення на синтез каротиноїдів деякими штамми базидіоміцетів / А.К. Велигодська, О.В. Федотов, А.С. Петреєва. // Біологічний вісник Мелітопольського державного педагогічного університету ім. Богдана Хмельницького, 2014. № 1 (9). – С. 22-34.
  38. Велигодська А.К. Вплив мікроелементів на накопичення каротиноїдів деякими штамми базидіоміцетів / А.К. Велигодська, О.В. Федотов // Біологічний вісник Мелітопольського державного педагогічного університету ім. Богдана Хмельницького, 2016. № 2 (6). – С. 181-187.
  39. Велигодська А.К. Вплив певних вітамінів на синтез поліфенольних речовин деякими базидіоміцетами / А.К. Велигодська, О.В. Федотов // Біологічний вісник Мелітопольського державного педагогічного університету ім. Богдана Хмельницького, 2013. № 3 (9). – С. 24-36.
  40. Велигодська А.К. Вміст меланінів у базидіальних грибів порядків *Polyporales* та *Agaricales* / А.К. Велигодська, О.В. Федотов // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – 3(23). – С. 72-83.
  41. Велигодська А.К. Отримання та аналіз препаратів каротиноїдів деяких штамів ксилотрофних базидіоміцетів / А.К. Велигодська, О.В. Федотов // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія. – 2016. – 24(2). – С. 290-294.
  42. Велигодська А.К. Порівняльна характеристика загального вмісту

- каротиноїдів у деяких видів базидіальних грибів / А.К. Велигодська, О.В. Федотов // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – 4(20). – С. 84-101.
43. Велигодська А.К. Скринінг вмісту та динаміка накопичення поліфенольних речовин у деяких видів базидіоміцетів / А.К. Велигодська, О.В. Федотов // Біологічний вісник Мелітопольського державного педагогічного університету ім. Богдана Хмельницького. – 2015. – 5(3). – С. 43-54.
  44. Ветчинкина Е.П. Особенности фенолоксидазного комплекса в процессе морфогенеза ксилотрофных базидиомицетов разных экологических групп / Е.П. Ветчинкина, Л.В. Степанова, В.Е. Никитина // Современная микология в России: Второй съезд микологов России: тез. докл. – М., 2008. – Т. 2. – С. 124.
  45. Виноградова Р.П. Одиниці вимірювання активності ферментів / Р.П. Виноградова // Лабораторна діагностика. – 2002, № 2. – С. 36–40.
  46. Витол И.С. Использование пероксидазы и глютамаатдегидрогиназы в качестве биохимических маркеров в биотехнологических исследованиях на картофеле / И.С. Витол, О.С. Мелик-Саркисов, В.А. Аветисов, И.Г. Дубровский // Докл. ВАСХНИЛ. – 1989. – Т. 10. – С. 14–15.
  47. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
  48. Волошко Т.Є. Вплив вітаміну B<sub>12</sub> на активність антиоксидантних оксидоредуктаз базидіоміцету *Flammulina velutipes* / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // Матеріали XIII з'їзду Українського ботанічного товариства. – Львів, 2011. – С. 419.
  49. Волошко Т.Є. Вплив електромагнітних полів на активність оксидоредуктаз деяких видів базидіоміцетів / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // Біологічний вісник Мелітопольського державного

- педагогічного університету ім. Богдана Хмельницького, 2013. № 2 (8). – С. 45-56.
50. Волошко Т.Є. Скринінг штамів базидіоміцетів за активністю антиоксидантних оксидоредуктаз / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // Мікробіологія і біотехнологія. – 2011. – №. 4(16). – С. 69-81.
51. Волошко Т.Є. Вплив деяких мікроелементів на активність оксидоредуктаз базидіоміцетів / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – 1(21). – С. 63-80.
52. Вплив джерел вуглецевого живлення на синтез поліфенольних речовин базидіоміцету *Fistulina hepatica* Fh-08/ А.К. Велигодська А.С. Петреєва, О.В. Федотов // Біотехнологія: звершення та надії. Матеріали II Всеукраїнської науково-практичної конференції. – К.: НУБіПУ, 2013. – С. 44-45.
53. Гавриленко Г.В. Зміна каталазної активності культур *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. під час культивування / Г.В. Гавриленко, О.В. Федотов // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Сер. «Біологічні науки». – 2002. – 15(27). – С. 52-54.
54. Гаврилова В.П. Биотехнологическое использование базидиомицета *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. / В.П. Гаврилова, Н.С. Яковлева // Успехи медицинской микологии / Под ред. Ю.В. Сергеева. – М.: Национальная академия микологии, 2003. – 1. – С. 261–263.
55. Гаврилова В.П. Возможности нетрадиционного использования базидиомицетов в кожевенном и текстильном производстве / В.П. Гаврилова, И.И. Шамолина, Н.В. Белова // Биотехнология, 2002. – № 5. – С. 74–80.
56. Гарибова Л.В. Основы микологии: Морфология и систематика грибов грибоподобных организмов. Учебное пособие. / Л.В. Гарибова, С.Н. Лекомцева. – М.: ТНИ КМК. 2005. – 220 с.

57. Гвоздкова Т.С. Глубинный мицелий ксантофилсодержащего гриба *Laetiporus sulphureus* – основа новой биологически активной добавки / Т.С. Гвоздкова, Л.Т. Мишин, Т.В. Черноок, Л.В. Пленина, А.Н. Капич // Успехи медицинской микологии. – 2004. – № 3. – С. 218–220.
58. Гвоздкова Т.С. Эффективность антиоксидантного действия различных концентраций спиртового экстракта из мицелия каротинсинтезирующего гриба *Laetiporus sulphureus* / Т.С. Гвоздкова, О.Н. Сорока, Т.В. Черноок, М.В. Залашко // Материалы Международной конференции "Микробиология и биотехнология XXI столетия", Минск, 2002. – С. 24–25.
59. Гесслер Н.Н. Активность супероксиддисмутазы и каталазы у каротиноидсинтезирующих грибов *Blakeslea trispora* и *Neurospora crassa* в условиях окислительного стресса / Н.Н. Гесслер, А.В. Соколов, В.Я. Быховский, Т.А. Белозерская // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38, – № 3. – С. 237–242.
60. Гесслер Н.Н. Сравнительное исследование компонентов антиоксидантной защиты в процессе роста мицелия дикого типа *Neurospora crassa* и мутантов *white color-1* и *white color-2* / Н.Н. Гесслер, О.А. Леонович, М.Я. Рабинович // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, – № 3. – С. 332–337.
61. Граскова И.А. Изменение активности пероксидазы клеток картофеля при патогенезе кольцевой гнили / И.А. Граскова, С.В. Владимирова, А.В. Колесниченко // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія "Біологія" – 2002. – № 9 (1), – С. 37–44.
62. Гулич М.П. Иммуномодулирующее действие съедобного лекарственного гриба шиитаке *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. / М.П. Гулич, Н.А. Бисько, Н.Ю. Митропольская, В.Т. Билай // Перспективы использования лекарственных грибов при решении медико–экологических проблем: мат–лы междунар. науч. практ. конф., 10–11 сент. 2004 г. – Киев, 2004. – С. 35–37.

63. Данилова Л.А. Антиоксидантные свойства и содержание фенольных соединений в растительных экстрактах / Л.А. Данилова, Л.А. Чернова, Ф.Э. Ицков, И.Н. Демидов // Пищевая промышленность. – 1992, – № 10. – С. 7–8.
64. Даниляк М.І. Лікарські гриби. Медичне застосування та проблеми біотехнології / М.І. Даниляк, С.В. Решетников – К.: Ін-т ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, 1996. – 65 с.
65. Даниляк Н.И. Ферментные системы высших базидиомицетов / Н.И. Даниляк, В.Д. Семичаевский, Л.Г. Дудченко, И.А. Трутнева. – К.: Наук. думка, 1989. – 279 с.
66. Деклараційний патент на винахід 40900А Україна, МПК 7С12М1/04, С12М1/38. Лабораторна ферментаційна установка для культивування базидіомицетів. / С.Ф. Негруцький, М.І. Бойко, О.В. Федотов, В.О. Полях. № 2000105818, заявл. 16.10.00, опубл. 15.08.2001, Бюл. № 7.
67. Денисова Н.П. Тромболитические свойства ферментов базидиальных грибов / Н.П. Денисова // Проблемы медицинской микологии. – 2009. – № 4. – С. 3-9.
68. Диксон М. Ферменты / М. Диксон, Э. Уэбб. – М.: Мир, 1982. – Т. 1. – 899 с.
69. Дорофеев А.Н. Антиоксиданты растительного происхождения: распространение, свойства, возможные области применения / А.Н. Дорофеев, Ю.А. Акимов, И.В. Грига // Биоантиоксиданты: тез. докл. IV Всесоюз. науч. конф. – М., 1993, – С. 16–17.
70. Досон Р. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – М.: Мир, 1991. – 290 с.
71. Дуган О.М. Нанобіотехнології – вчора, сьогодні, завтра / О.М. Дуган, М.В. Михальченко // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2011. – Вип. 6. – С. 14-26.
72. Дудка И.А. Культивирование съедобных грибов / И.А. Дудка, Н.А. Бисько, В.Г. Билай. – К.: Урожай, 1992. – 160 с.

73. Дудка И.А. Методы экспериментальной микологии. Справочник. / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.
74. Дудка І.О. Екологічні аспекти збереження та використання природних лісів у помірній зоні Європи / І.О. Дудка // Еколог. вісн. – 2004. – № 2. – С. 22-25.
75. Дьяков Ю.Т. Введение в альгологию и микологию / Ю.Т. Дьяков. – М.: МГУ, 2000. – 190 с.
76. Дьяков Ю.Т. Введение в генетику грибов: Учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / Ю.Т. Дьяков, А.В. Шнырева, А.Ю. Сергеев. – М.: Академия, 2005. – 304 с.
77. Егоров А.М. Аналитическое применение ферментов / А.М. Егоров // Биотехнология. – М., 1984. – С. 149–154.
78. Жданова Н.Н. Меланин-содержащие грибы в экстремальных условиях / Н.Н. Жданова, А.И. Василевская. – К.: Наук. думка, 1988. – 196 с.
79. Змитрович И.В. Эволюционно–таксономические аспекты поиска и изучения лигнинразрушающих грибов – активных продуцентов окислительных ферментов / И.В. Змитрович, Н.В. Псурцева, Н.В. Белова // Микология и фитопатология. – 2007. – Т. 41, вып. 1. – С. 57–78.
80. Иконникова Н.В. Действие ингибиторов на меланиногенез грибов *Phellinus robustus* М-10 *Inonotus obliquus* В-26 / Н.В. Иконникова, В.В. Щерба, В.Г. Бабицкая // Современная микология в России: Второй съезд микологов России: тез. докл. – М., 2008. – Т. 2. – С. 128–129.
81. Калинина Н.В. Взаимосвязь синтеза  $\beta$ -каротина и зиготообразования у гетероталлических штаммов *Blakeslea trispora* / Н.В. Калинина, В.М. Терешина, А.С. Меморская, Е.П. Феофилова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007, – Т. 43, – № 1. – С. 69–76.

82. Капич А.Н. Антиоксидантные и прооксидантные свойства ксилотрофных базидиомицетов // Усп. мед. микологии. – 2006. – 5, гл. 6. – С. 89–191.
83. Капич А.Н. Антиоксидантные, радиозащитные и противовирусные свойства экстрактов мицелия гриба *Laetiporus sulphureus* / А.Н. Капич, Т.С. Гвоздкова, З.Б. Квачева, С.Н. Николаева, Л.Н. Шишкина, С. Галкин, А. Хатакка, Е.Ф. Конопля, Г.Г. Верещако, А.М. Ходосовская, Ж.А. Рутковская // Успехи медицинской микологии / Под ред. Ю.В.Сергеева. – М.: Национальная академия микологии, 2004. – 3. – С. 146– 148.
84. Капич А.Н. Сопряжение перекисного окисления липидов с деградацией лигнина у дереворазрушающих базидиомицетов / А.Н. Капич. // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. – 2011. – Т. 3. – С. 316-335.
85. Капустян А.В. Активність пероксидази та зміна її ізоферментних форм за умов низькотемпературного стресу / А.В. Капустян , В.П. Кучеренко, О.О. Панюта, М.М. Мусієнко // Физиология и биохимия культ. растений. – 2004. – Т. 36. – № 1. – С. 55–63.
86. Корнейчик Т.В. Прооксидантная активность дереворазрушающих базидиомицетов в условиях твердофазного культивирования / Т.В.Корнейчик, А.Г.Мицкевич, А.Н. Капич // Весці Нац. акадэміі навук Беларусі. Сер. біял. навук, 2010, No.3 – С. 94-98.
87. Королева О.В. Иммуноферментный анализ разложения гербицида почвенными и дереворазрушающими грибами / О.В. Королева, Е.В. Степанова, Е.О. Ландесман, Л.Г. Васильченко, В.В. Хромоныгина, А.В. Жердев, М.Л. Рабинович // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002, – Т. 38, – № 4. – С. 413–418.
88. Королева О.В. Сравнительная характеристика грибного меланина и гуминоподобных веществ, синтезируемых *Serrena maxima* 0275 / О.В. Королева, Н.А. Куликова, Т.Н. Алексеева, Е.В. Степанова, В.Н.



- Давидчик, Е.Ю. Беляева, Е.А. Цветкова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007, – Т. 43, – № 1. – С. 69–76.
89. Костіков І.Ю. Ботаніка. Водорості та гриби: Навчальний посібник. / І.Ю. Костіков, В.В. Джаган, Е.М. Демченко, О.А. Бойко, В.Р. Бойко, П.О. Романенко. – К.: Арістей, 2006. – 476 с.
  90. Краснопольская Л.М. Стратегия оптимизации способов культивирования лекарственных грибов / Л.М. Краснопольская, И.В. Белицкий, А.В. Антимонава, Н.Ю. Соболева // Успехи медицинской микологии. Материалы второго всероссийского конгресса по медицинской микологии. – М., 2004. – Т. 3. – С. 222–224.
  91. Кудінова О.В. Активність пероксидази в паростках сосни звичайної, уражених *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. (коренева губка) / О.В. Кудінова, М.І. Бойко // Питання біоіндикації та екології. – Вип. 6, – №2. – Запоріжжя, 2001. – С. 83-88.
  92. Куликова Н.А. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты (обзор) / Н.А. Куликова, О.И. Кляйн, Е.В. Степанова, О.В. Королева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, № 6. – С. 619–634.
  93. Кучеренко В.П. Фермент пероксидаза і зимостійкість рослин. / В.П. Кучеренко, А.В. Капустян. – К.: УФЦ. – 2004. – 115 с.
  94. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1973. – 343 с.
  95. Линовицкая В.М. Влияние различных источников азота и углерода на рост высших дереворазрушающих базидиальных грибов / В.М. Линовицкая, Л.П. Дзыгун, И.Р. Клечак, А.С. Бухало // Современная микология в России: Второй съезд микологов России: тез. докл. – М., 2008. – Т. 2. – С. 335.
  96. Макович О.М. Влияние эффекторов на биосинтез внеклеточной пероксидазы *Phellinus robustus* K. / О.М. Макович, Р.В. Михайлова,

- А.Г. Лобанок, О.В. Чихаева // Современная микология в России: Второй съезд микологов России: тез. докл. – М., 2008. – Т. 2. – С. 111.
97. Максимов В.Н. Многофакторный эксперимент в биологии / В.Н.Максимов. – М.: Просвещение, 1980. – 180 с.
  98. Максимов В.Н. Оптимизация состава питательной среды методом математического планирования эксперимента / В.Н. Максимов, М.Н. Пименова, Н.Н. Гречушкина // Практикум по микробиологии. – М.: МГУ. 1976. – С. 153-163.
  99. Мелехова О.П. Биологический контроль окружающей среды. Биоиндикация и биотестирование: учеб. пособие для студентов вузов / О.П. Мелехова, Е.И. Сарапульцева, Т.И. Евсеева – М.: Академия, 2007. – 287 с.
  100. Мельничук В.А. Антиокислительная активность некоторых средств растительного происхождения / В.А. Мельничук, Т.В. Починок, В.А. Портнягина, А.П. Дегтярева // Фармакология и токсикология. – 1988, – № 23. – С. 79–83.
  101. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков, В.В. Арасимович, Н.П. Ярош и др.; Под ред. А.И. Ермакова. – Л.: Агропромиздат. Ленингр. отд-ние, 1987. – 430 с.
  102. Мироник О.В. Механізм дії та практичне застосування антиоксидантів рослинного походження / О.В. Мироник // Інфекційні хвороби – 1999. – № 1. – С. 55–58.
  103. Михайлова Р.В. Образование внеклеточной каталазы видами рода *Penicillium* / Р.В. Михайлова, О.М. Осока, А.Г. Лобанок // Микология и фитопатология. – 2001. – Т. 35. – № 3. – С. 43–46.
  104. Мороз И.В. Морфолого-физиологическая характеристика *Penicillium piceum* F-648 – продуцента каталазы / И.В. Мороз, Р.В. Михайлова // Современная микология в России: Второй съезд микологов России: тез. докл. – М., 2008. – Т. 2. – С. 134.

105. Мусієнко М.М. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин / М.М. Мусієнко, Т.В. Паршикова, П.С. Славний. – К.: Фітоцентр, 2001. – 200 с.
106. Нанагулян С.Г. Возрастание пероксидазной активности культуры *Pl. ostreatus* (Jacq.: fr.) Kumm. в ответ на стрессовое воздействие / С.Г. Нанагулян, И.А. Авагян, А.В. Неркарян, Л.А. Минасбекян // Современная микология в России: Второй съезд микологов России: тез. докл. – М., 2008. – Т. 2. – С. 135–136.
107. Негруцкий С.Ф. Физиология и биохимия низших растений: Учеб. пособие. / С.Ф. Негруцкий. – К.: Выща школа., 1990. – 191с.
108. Низковская О.П. Белки, ферменты и стеринны базидиальных грибов / О.П. Низковская. – Л.: Наука, 1979. – 72 с.
109. Озерецковская О.Л. К вопросу о получении и практическом использовании растительных пероксидаз / О.Л. Озерецковская, Л.И. Ильинская, Н.И. Васюкова // Физиология растений. – 1994. – Т. 41. – № 4. – С. 626–633.
110. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. Е.Б. Меньшикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков, И.А. Бондарь, Н.Ф. Круговых, В.А. Труфакин. – М.: Фирма "Слово", 2006. – 554 с.
111. Павловская Ж.И. Влияние компонентов питательной среды на образование внеклеточной каталазы *Penicillium piceum* F-648 / Ж.И. Павловская, И.В. Мороз, Р.В. Михайлова, А.Г. Лобанок, А.Н. Яремин // Биотехнология, – 2001, – № 3, – С. 18–24.
112. Павловская Ж.И. Влияние условий культивирования *Penicillium piceum* F-648 на образование каталазы и глюкозооксидазы / Ж.И. Павловская, Р.В. Михайлова, И.В. Мороз // Микология и фитопатология. – 2004. – Т. 38. – № 1. – С. 77–82.
113. Паршин А.А. Деструкция фенола грибом «белой гнили» *Lentinus tigrinus* / А.А. Паршин, О.С. Надежина, Д.А. Кадималиев, Н.А.

Атыкян // Современная микология в России: Второй съезд микологов России: тез. докл. – М., 2008. – Т. 2. – С. 337–338.

114. Пат. на корисну модель 110849 Україна, МПК A01G1/04(2006.01). Спосіб біоконверсії лігноцелюлозних відходів переробки олійних культур з використанням дереворуйнівного базидіоміцету *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill / О.В. Федотов, А.К. Велигодська. № u201603509, заявл. 04.04.2016, опубл. 25.10.2016, Бюл. № 20.
115. Пат. на корисну модель 38623 Україна, МПК (2009), A01H15/00, C12N1/14. Спосіб індукції пероксидазної активності базидіоміцетів *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. та *Lentinula edodes* (Berk.) Sing. аскорбіноюю кислотою / О.В. Федотов, Т.Є. Волошко. № u200809174, заявл. 14.07.2008, опубл. 12.01.2009, Бюл. № 1.
116. Пат. на корисну модель 39027 Україна, МПК (2009), A01G7/00, A01H3/00. Спосіб індукції пероксидазної активності базидіоміцетів *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. та *Lentinula edodes* (Berk.) Sing. нікотиноюю кислотою / О.В. Федотов, Т.Є. Волошко. № u200809154, заявл. 14.07.2008, опубл. 26.01.2009, Бюл. № 2.
117. Пат. на корисну модель 8713 Україна, МПК 7C12N9/58, A61K38/00. Спосіб одержання ферментних препаратів каталази *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. і *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. / О.В. Федотов. № 200501341, заявл. 14.02.2005, опубл. 15.08.2005, Бюл. № 8.
118. Пат. на корисну модель 8739 Україна, МПК 7C12N9/58. Спосіб одержання ферментного препарату пероксидази *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. / О.В. Федотов, О.Ю. Кваско. № 200501510, заявл. 18.02.2005, опубл. 15.08.2005, Бюл. № 8.
119. Пат. на корисну модель 91411 Україна, МПК C12N1/14(2006.01), A01G1/04(2006.01). Спосіб одержання ферментного препарату каталази штаму *Pleurotus ostreatus* P-208 / О.В. Федотов, Т.Є. Волошко. № u201310997, заявл. 16.09. 2013, опубл. 10.07.2014,

Бюл. № 13.

120. Пат. на корисну модель 91413 Україна, МПК C12N1/14(2006.01), A01G1/04(2006.01). Спосіб одержання ферментного препарату пероксидази штаму *Agrocybe cylindracea* 167 / О.В. Федотов, Т.Є. Волошко. № u201311000, заявл. 16.09.2013, опубл. 10.07.2014, Бюл. № 13.
121. Пирог Т.П. Загальна біотехнологія: Підруч./ Т.П. Пирог, О.А. Ігнатова – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
122. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.
123. Поединок Н.Л. Повышение эффективности промышленного культивирования съедобного гриба вешенки обыкновенной / Н.Л. Подинок, Н.А. Бисько, О.Б. Михайлова, Ж.В. Потемкина, А.М. Негрийко // Биотехнология. – 2004. – № 5. – С. 64–66.
124. Рабинович М.Л. Разложение природных ароматических структур и ксенобиотиков грибами / М.Л. Рабинович, А.В. Болобова, Л.Г. Васильченко // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, – № 1. – С. 5–23.
125. Регуляція росту та антиоксидантної активності культур базидіоміцетів вуглець- та азотовмісними речовинами / О.В. Чайка, Я.А. Зборовська, О.В. Федотов // Біотехнологія: звершення та надії. Матеріали II Всеукраїнської науково-практичної конференції. – К.: НУБіПУ, 2013. – С. 24-25.
126. Решетникова И.А. Поиск грибов – продуцентов пероксидазы / И.А. Решетникова, И.Г. Газарян, А.Н. Веревкин, В.А. Фечина, Т.Г. Мирошниченко, А.М. Егоров // Микология и фитопатология. – 1992. – Т. 26. – № 5. – С. 383–387.
127. Свердлова Н.И. Получение пероксидазы из базидиальных грибов / Н.И. Свердлова, В.П. Гаврилова, И.И. Шамолина // Методы получения, анализа и применения ферментов: Всес. научн. конф.: тезисы докл. – Рига, 1990. – С. 90.

128. Сейфулла Р.Д. Проблемы фармакологии антиоксидантов / Р.Д. Сейфулла, И.Г. Борисова // Фармакология и токсикология. – 1990. – 53, – № 6. – С. 3–10.
129. Сирчін С.О. Оцінка антиоксидантної активності деяких дикорослих макроміцетів. / С.О. Сирчін, Г.А. Гродзинська. // Укр. ботан. журн. – 2015. – 72(3). – С. 257-260.
130. Смирнов С.А. Лакказы из базидиомицетов: физико-химические характеристики и субстратная специфичность по отношению к метоксифенольным соединениям / С.А. Смирнов, О.В. Королева, В.П. Гаврилова, А.Б. Белова, Н. Клячко // Биохимия. – 2001, – Т. 66, – № 7. – С. 774–779.
131. Соболева Н.Ю. Антибиотические свойства и рост в погруженной культуре штаммов лекарственного базидиального гриба *Lentinus edodes*. / Н.Ю. Соболева, Л.М. Краснопольская, Г.Б. Федорова, Г.С. Катруха // Успехи медицинской микологии. Материалы второго всероссийского конгресса по медицинской микологии. – М., 2004. – Т. 3. – С. 240-242.
132. Соломко Е.Ф. Вплив хімічних речовин на інтенсивність перекисного окислення ліпідів грибів *Flammulina velutipes* (Curt. ex fr.) Sing. та *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. / Е.Ф. Соломко, О.В. Федотов, О.В. Чайка // Природа Західного Полісся та прилеглих територій: Збірник наукових праць Волинського національного університету імені Лесі Українки. – № 7. – Луцьк: ВНУ, 2010. – С. 146-149.
133. Соломко Е.Ф. Ріст окремих видів лікарських макроміцетів на поживних середовищах різного складу / Е.Ф. Соломко, М.Л. Ломберг, Н.Ю. Митропольська, О.В. Чоловська // Український ботанічний журнал. – 2000. – 57, – № 2. – С. 119–125.
134. Соломко Е.Ф. Вплив хімічних речовин на інтенсивність перекисного окислення ліпідів грибів *Flammulina velutipes* (Curt. ex fr.) Sing. та *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. / Е.Ф. Соломко, О.В. Федотов, О.В. Чайка

- // Природа Західного Полісся та прилеглих територій. – 2010. – 7. – С. 146-149.
135. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии. / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.
  136. Сухомлин М.М. Статеве розмноження вищих базидіоміцетів / М.М. Сухомлин. – Донецьк: ДонНУ, 2001. – 173 с.
  137. Таран Н.Ю. Вторинний оксидний стрес як елемент загальної адаптивної відповіді рослин на дію несприятливих факторів довкілля / Н.Ю. Таран, О.А. Оканенко, Л.М. Бацманова, М.М. Мусієнко // Фізіологія і біохімія культ. рослин. – 2004. – Т. 36. – № 1. – С. 3–14.
  138. Терехова В.А. Микотестирование химических воздействий / В.А. Терехова // Материалы 2-го Съезда микологов России. Современная микология в России – М.: Национальная академия микологии, 2008. – Т 2. – С. 106–108.
  139. Терехова В.А. Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем / В.А. Терехова. – М.: Наука, 2007. – 216 с.
  140. Федотов О.В. Активність пероксидаз істівних лікарських базидіоміцетів у залежності від температури культивування та місцезростання / О.В. Федотов // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2004. – 4. – С. 183-188.
  141. Федотов О.В. Активність ПОЛ і каталази макроміцетів – як можливі біоіндикаційні показники екологічного стану їх місця зростання / О.В. Федотов, А.М. Євсєєнкова, М.С. Перцевой // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Сер. «Сільськогосподарські науки». – 2008. – 82. – С. 73-81.
  142. Федотов О.В. Амінокислотний склад білків ферментних препаратів молокозсідальної дії з ксилотрофа *Irpex lacteus* Fr. / О.В. Федотов // Проблеми ботаніки і мікології на порозі третього тисячоліття.

- Матеріали Х з'їзду УБТ. – Київ-Полтава, 1997. – С. 109.
143. Федотов О.В. Амінокислотний склад ферментних препаратів каталази їстівних лікарських грибів *Flammulina velutipes* і *Pleurotus ostreatus* / О.В. Федотов // Вісник Донецького університету. Сер. А: Природничі науки. – 2005. – 2. – С. 247-250.
144. Федотов О.В. Амінокислотний склад ферментних препаратів пероксидаз їстівних лікарських грибів *Lentinus edodes*, *Flammulina velutipes* і *Pleurotus ostreatus* / О.В. Федотов // Вісник Донецького університету. Сер. А: Природничі науки. – 2006. – 2. – С. 270-274.
145. Федотов О.В. Антиокисна активність міцелію штамів грибів родів *Pleurotus* (Fr.) Kumm. і *Flammulina* (Curt.: Fr.) Sing. / О.В. Федотов // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Сер. «Біологічні науки». – 2002. – 16(28). – С. 63-66.
146. Федотов О.В. Біоконверсія лушпиння соняшника дереворуйнівним сапрофітним грибом *Hirschioporus laricinus* (Karst.) Ryv. / О.В. Федотов, С.Ф. Негруцький // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2002. – 2. – С. 186-190.
147. Федотов О.В. Вміст продуктів перекисного окислювання ліпідів в міцелії грибів родів *Pleurotus* (Fr.) Kumm. та *Lentinus* (Berk.) Sing. / О.В. Федотов // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Сер. «Біологічні науки». – 2003. – 22(34). – С. 79-81.
148. Федотов О.В. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів в лікарських базидіоміцетах національного природного парку «Святі гори» / О.В. Федотов // Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія. – 2005. – 260. – С. 254-259.
149. Федотов О.В. Вплив бензопірену на інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів штаму *Pleurotus ostreatus* P-107 / О.В. Федотов, О.В. Чайка, О.Г. Метрусенко // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2012. – 1(12). – С. 252-258.



150. Федотов О.В. Вплив джерел вуглецевого живлення на ріст і каталазну активність штаму Р-6v *Pleurotus ostreatus* / О.В. Федотов, О.М. Брусніцина // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2008. – 1(8). – С. 248-253.
151. Федотов О.В. Вплив нікотинової кислоти на пероксидазну активність штамів їстівних лікарських базидіоміцетів *Pleurotus ostreatus* та *Lentinula edodes* / О.В. Федотов, Т.Є. Волошко // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2008. – 1(8). – С. 253-256.
152. Федотов О.В. Вплив рН живильного середовища на активність антиоксидантних оксидоредуктаз *Fistulina hepatica* / О.В. Федотов, Т.Є. Волошко // Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів. – К.: ІФРiГ НАНУ, 2012. – С. 233-234.
153. Федотов О.В. Динаміка активності пероксидази та ростових показників штаму F-vv *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. / О.В. Федотов, Ю.В. Горяшник // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Сер. «Біологічні науки». – 2003. – 25(37). – С. 42-44.
154. Федотов О.В. Динаміка росту та вмісту продуктів перекисного окислювання ліпідів в культурах *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm. / О.В. Федотов, О.А. Крюков // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Сер. «Біологічні науки». – 2003. – 32(44). – С. 22-25.
155. Федотов О.В. Динаміка росту та каталазної активності штамів *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. з різних екологічних місць зростання / О.В. Федотов // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2003. – 3. – С. 194-198.
156. Федотов О.В. Загальна антиоксидантна активність деяких штамів базидіальних грибів в динаміці росту / О.В. Федотов // Біологічний вісник Мелітопольського державного педагогічного університету

- ім. Богдана Хмельницького. – 2016. – 2(6). – С. 158-165.
157. Федотов О.В. Загальний вміст поліфенольних речовин у деяких видів базидіоміцетів / О.В. Федотов, А.К. Велигодська // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – 3(19). – С. 44-55.
158. Федотов О.В. Зв'язані амінокислоти і білок ферментних препаратів молокозсідальної дії у афілофорових грибів / О.В. Федотов, М.І. Бойко, С.Ф. Негруцький // Український ботанічний журнал. – 2002. – 59(1). – С. 45-48.
159. Федотов О.В. Інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів штамів базидієвих грибів. / О.В. Федотов // Актуальні питання розвитку біології та екології. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції. – Вінниця: ТОВ «Нілан-ЛТД». – 2016. – С. 294-297.
160. Федотов О.В. Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів штамів грибів порядків *Agaricales* і *Polyporales* / О.В. Федотов // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія. – 2016. – 24(2). – С. 314-323.
161. Федотов О.В. Колекція культур шапинкових грибів – основа мікологічних досліджень та стратегії збереження біорізноманіття базидіоміцетів / О.В. Федотов, О.В. Чайка, Т.Є. Волошко, А.К. Велигодська // Вісник Донецького університету, Сер. А: Природничі науки. – 2012. – 1. – С. 209–213.
162. Федотов О.В. Лікарські речовини рослин і грибів. Моногр. у вигляді навчального посібника. / О.В. Федотов. – Донецьк: Норд Комп'ютер, 2007. – 204 с.
163. Федотов О.В. Мікотестування забруднення навколишнього середовища фенолом / О.В. Федотов, М.С. Перцевой // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2010. – 1(10). – С. 208-214.
164. Федотов О.В. Молокозсідальна і антиокисна активність ферментних

- препаратів штамів афілофорових грибів / О.В. Федотов // Збірник наукових праць Луганського державного аграрного університету. Сер. «Біологічні науки». – 2001. – 9(21). – С. 136-141.
165. Федотов О.В. Пероксидазная активность штаммов *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. / О.В. Федотов, Р.Б. Такташов // Микология и альгология – 2004. Материалы юбилейной конференции к 85-летию кафедры микологии и альгологии МГУ им. М.В. Ломоносова. – М.: Прометей МПГУ, 2004. – С. 130-131.
166. Федотов О.В. Ріст та каталазна активність штамів грибів роду *Pleurotus* (Fr). Kumm. / О.В. Федотов, Г.В. Гавриленко // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Сер. «Біологічні науки». – 2003. – 22(34). – С. 82-84.
167. Федотов О.В. Розробка способів отримання і аналіз ферментних препаратів пероксидаз та каталаз деяких видів базидіоміцетів / О.В. Федотов, Т.Є. Волошко // Біологічний вісник Мелітопольського державного педагогічного університету ім. Богдана Хмельницького. – 2013. – 1(7). – С. 113-127.
168. Федотов О.В. Стан прооксидантно-антиоксидантної системи деяких штамів базидіомікотових грибів / О.В. Федотов // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина. – 2017. – 8(1). – С. 77-84.
169. Федотов О.В. Фізико-хімічні показники мікологічних об'єктів у біоіндикації довкілля / О.В. Федотов // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2011. – 1(11). – С. 261-265.
170. Феофилова Е.П. Вклад современной микологии в создание биотехнологий медицинского назначения / Е.П. Феофилова, А.А. Алексеев, В.М. Терешина, А.С. Меморская // Успехи медицинской микологии / Под ред. Ю.В. Сергеева. – М.: Национальная академия микологии, 2004. – 3. – С. 139–141.

171. Чайка О.В. Вплив джерел вуглецевого та азотного живлення на біодеградацію ксенобіотиків культурами ксилотрофів / О.В. Чайка, О.В. Федотов // Біологічний вісник Мелітопольського державного педагогічного університету ім. Богдана Хмельницького, 2013. № 3 (9). – С. 109-124.
172. Чайка О.В. Ефективність біодеградації ксенобіотику *Methyl orange* культурами ксилотрофів у залежності від концентрацій пептону та глюкози / О.В. Чайка, О.В. Федотов // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону, 2013, – № 1 (13). – С. 221-227.
173. Чайка О.В. Інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів ксилотрофних базидіоміцетів у глибинній культурі / О.В. Чайка, О.В. Федотов // Біологічний вісник Мелітопольського державного педагогічного університету ім. Богдана Хмельницького, 2013. № 2 (8). – С. 220-236.
174. Чайка О.В. Культурально-морфологічні характеристики ксилотрофних базидіоміцетів у глибинній культурі / О.В. Чайка, О.В. Федотов // Біологічний вісник Мелітопольського державного педагогічного університету ім. Богдана Хмельницького, 2013. № 1 (7), – С. 128-146.
175. Чайка О.В. Оцінка екологічного стану довкілля з використанням прооксидантно-антиоксидантної активності культур базидіоміцетів / О.В. Чайка, О.В. Федотов // Науковий журнал «Біоресурси і природокористування». – Т. 6. – № 1-2, 2014. – С. 5-11.
176. Чайка О.В. Порівняльна характеристика динаміки перекисного окиснення ліпідів штамів їстівних лікарських грибів *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. та *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing. / О.В. Чайка, О.В. Федотов // Вісник Донецького національного університету. Сер. А: Природничі науки. – 2010. – 1. – С. 241-245.
177. Чайка О.В. Ріст та інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів штаму *Pleurotus ostreatus* P-107 / О.В. Чайка, О.В. Федотов //

- Мікробіологія і біотехнологія. – 2011. – 3(15). – С. 88-96.
178. Шамардин В.А. Использование каталазы в иммуноферментных реакциях / В.А. Шамардин, Ю.А. Кузьмин, Б.В. Каральник // Лабораторное дело. – 1988, – № 4. – С. 67–68.
179. Шиврина А.Н. Биосинтетическая деятельность высших грибов / А.Н. Шиврина, О.П. Низковская, Н.Н. Фалина, Н.Л. Маттисон, О.М. Ефименко. – Л.: Наука, 1969. – 241 с.
180. Шишкина Л.Н. Регуляция процессов перекисного окисления липидов в мицелии дереворазрушающих грибов белой и бурой гнили / Л.Н. Шишкина, А.Н. Капич. // Первый конгресс микологов России: тез. докл. – 2002. – С. 148-150.
181. Al Zidan N. Ali. A review on antitumor actions of polysaccharide isolated from medicinal mushrooms / Ali N. Al Zidan, H. Alneameh // Int. J. Acad. Sci. Res. – 2014. – V. 2, N 1. – P. 14–20.
182. Alvarez–Parrilla E. Total phenol and antioxidant activity of commercial and wild mushrooms from Chihuahua, Mexico / E. Alvarez–Parrilla, L.A. de la Rosa, N. R. Martinez Aguilar, G.A. Gonzalez // Cienc. Technol. Aliment.– 2007. – V. 5, N 5. – P. 329–334.
183. Alves M.J. Review on antifungal activity of mushroom (basidiomycetes) extracts and isolated compounds / M. J. Alves, I. C. Ferreira, J. Dias, V. Teixeira, [et al.] // Curr. Top. Med. Chem. – 2013. – V. 13, N 21. – P. 2648–2659.
184. Alves M.J. Review on antimicrobial activity of mushroom (*Basidiomycetes*) extracts and isolated compounds / M. J. Alves, I. C. Ferreira, J. Dias, V. Teixeira, [et al.] / Planta Med. – 2012. – V. 78, N 16. – P. 1707–1718.
185. Amorim A.M. The application of catalase for the elimination of hydrogen peroxide residues after bleaching of cotton fabrics / A. M. Amorim // Ann. Brasil. Acad. Sci. – 2002. – V. 74, N 3. – P. 433–436.

186. Aqueveque P. Antimicrobial activity of metabolites from mycelial cultures of chilian basidiomycetes / P. Aqueveque, J. Becerra, G. Palfner [et al.] // J. Chil. Chi. Soc. – 2006. – V. 51, N 4. – P. 1057–1060.
187. Arango C.S. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutracéuticos / C. S. Arango, I. J. Nieto // Rev. Iberoamericana Micol. – 2013. – V. 30, N 1. – P. 1–8.
188. Arias C.A. Antibiotic-resistant bugs in the 21st Century – A Clinical Super-Challenge / C.A. Arias, B.E. Murray // New Engl. J. Med. – 2009. – V. 360, N 5. – P. 439–443.
189. Asatiani M.D. Antioxidant activity of submerged cultured mycelium extracts of higher basidiomycetes mushrooms / M.D. Asatiani, V. Elisashvili, S.P. Wasser [et al.] // Int. J. Med. Mushr. – 2007. – N 9. – P. 151–158.
190. Asatiani M.D. Antioxidant and free-radical scavenging activity of submerged mycelium extracts from aphylloroid mushrooms / M.D. Asatiani, V. Elisashvili, S.P. Wasser, A.Z. Reznick, E. Nevo // Mycologia Balcanica. – 2007. – 4. – P. 45–50.
191. Asatiani M.D. Free-radical scavenging activity of submerged mycelium extracts from higher basidiomycetes mushrooms / M.D. Asatiani, V. Elisashvili, S. P. Wasser [et al.] // Biosci. Biotech. Biochem. – 2007. – N 71. – P. 3090–3092.
192. Asatiani M.D. Higher basidiomycetes mushrooms as a source of antioxidants / M.D. Asatiani, V. Elisashvili, G. Songulashvil, A.Z. Reznick, S.P. Wasser. // Progress in Mycology / Eds M. Rai, G. Kövics. – Springer, 2010. – P. 311–326.
193. Atri N. S. Effect of vitamins and growth regulators on the vegetative growth of *Lentinus connatus* Berk / N. S. Atri, D. Kumari, S. K. Sharma // Indian J. Mushr. – 2010. – V. 28, N 1–2. – P. 63–69.

194. Atri N. S. Effect of vitamins and growth regulators on the vegetative growth of *Lentinus squarrosulus* / N. S. Atri, B. Kumari, R. Singh, R. C. Upadhyay // *Mycosphere*. – 2013. – V. 4, N 6. – P. 1080–1090.
195. Avalos J. Fungal carotenoid production /J. Avalos, E. Cerda–Olmedo // [eds. D. K. Arora, P. D. Bridge, D. Bhatnagar] – Handbook of fungal biotechnology. – N. Y.: Marcel Dekker, 2004. – P. 367–378.
196. Babitskaya V.G. Melanin complex from medicinal mushroom *Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.) Pilat (Chaga) (Aphyllorphomycetideae) / V.G. Babitskaya, V.V. Scherba, N.V. Ikonnikova [et al.] // *Int. J. Med. Mushr.* – 2002. – N 4. – P. 139–146.
197. Babitskaya V.G. Melanin complex from medicinal mushroom *Phellinus robustus* (P. Karst.) Bourd. et Galz / V.G. Babitskaya, N.A. Bisko, V.V. Scherba, N.Yu. Mitropolskaya // *Int. J. Med. Mushr.* – 2008. – 5, N 3. – P. 301–305.
198. Babitskaya V.G. Some biologically active substances from medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllorphomycetideae) / V.G. Babitskaya, N.A. Bisko, V.V. Scherba, N.Yu. Mitropolskaya // *Int. J. Med. Mushr.* – 2003. – 5, N 3. – P. 301–305.
199. Babitskaya V.G. Some physiological aspects of the submerged cultivation of culinary–medicinal shiitake mushroom *Lentinus edodes* (Agaricomycetideae) / V. G. Babitskaya, N. A. Bisko [et al.] // *Ibid.* – 2004. – V. 6, N 4. – P. 345–349.
200. Babitskaya V.G. The influence of different factors on the polysaccharide accumulation of *Ganoderma lucidum* / V. G. Babitskaya, N. A. Bisko, N. L. Poyedinok [et al.] // *Int. J. Med. Mushr.* – 2007. – V. 9, N 3&4. – P. 274.
201. Badalian S.M. Pharmacological activity of macroscopic fungi: *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing., *Paxillus involutus* (Batsch.: Fr.) Fr. and *Tricholoma tigrinum* Schaeff. (Basidiomycotina) / S.M. Badalian, J.J.

- Serrano, S. Rapior, C. Andary // Intern. J. Med. Mushrooms. – 2000. – P. 171–172.
202. Badalyan S. M. Edible and medicinal higher basidiomycetes mushrooms as a source of natural antioxidants / S. M. Badalyan // Int. J. Med. Mushr. – 2003. – V. 5, N 1. – P. 153–162.
203. Badalyan S.M. Antioxidant activity of several basidiomycete cultures / S.M. Badalyan, A.V. Gasparyan // Abstracts of 7th Intern. Mycolog. Congr. – Oslo, Norway, – 2002. – P. 96–97.
204. Badalyan S.M. Higher basidiomycetes as a prospective objects for mycopharmacological research / S.M. Badalian // Intern. J. Med. Mushrooms. – 2001. – Vol. 3, – N 2–3. – P. 108.
205. Balandykin M. E. Review on chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (higher basidiomycetes): Realm on medicinal applications and approaches on estimating its resource potential / M. E. Balandykin, I. V. Zmitrovich // Int. J. Med. Mushr. – 2015. – V. 17, N 2. – P. 95–104.
206. Barros L. Bioactive properties of the medicinal mushroom *Leucopaxillus giganteus* mycelium obtained in the presence of different nitrogen sources / L. Barros, P. Baptista, L.M. Estevinho, I.C.F.R. Ferreira // Food Chem. 2007. – 105. – P. 179–86.
207. Beelman R. B. L-Ergothioneine, a potent antioxidant in cultivated mushrooms: a review / R. B. Beelman, N. J. Dubost, V. Hausman // Int. J. Med. Mushr. – 2007. – V. 9, N 3–4. – P. 279–280.
208. Berdy J. Bioactive microbial metabolites / J. Berdy // J. Antibiot. – 2005. – V. 58, N 1. – P. 1–26.
209. Bilay V.T. Growth of edible mushrooms on commercial agar media / V.T. Bilay, E.F. Solomko, A.S. Buchalo // Mushroom Sci. – Maastricht, Netherlands: Balkena, 2000. – 15. – P. 779–782.
210. Biotechnological aspects of xylotrophic basidiomycetes culture fluid interfacial tensiometry and rheometry / A.V. Chaika, O.V. Fedotov, V.B. Fainerman, S.V. Lylyk // Biotechnologia Acta. – 2013. – 6(6). – P.



120-131.

211. Bisko N.A. Antioxidant and geneprotective effects of medicinal mushroom *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pil. and *Phellinus robustus* (P. Karst.) Bourd. et Galz / N.A. Bisko, V.G. Babitskaya, V.V. Scherba, N.Yu. Mitropolskaya, V.T. Bilay // Int. J. Med. Mushr. – 2005. N 7. – P. 388.
212. Bisko N.A. Biologically substances from mycelia of *Ganoderma lucidum* and *Lentinula edodes* / N.A. Bisko, V.T. Bilay, V.G. Babitskaya, V.V. Scherba, N.Y. Mitropolskaya, T.A. Puchkova // Mushroom Sci. – Miami (USA): Penn State Univ., 2004. 16. – P. 619–625.
213. Bisko N.A. Melanin complex from *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pil. (*Aphyllorphoromycetideae*) / N.A. Bisko, Mitropolskaya N.Yu. // Intern. J. Med. Mushrooms. – 2002. – Vol. 4, – № 2. – P. 139–146.
214. Bors W. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols / W. Bors, C. Michel // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2002. – Vol. 957. – P. 57–69.
215. Buchalo A.S. Investigations at the Ukrainian culture collection of edible and medicinal mushrooms / A.S. Buchalo, N.Yu. Mitropolskaya // Int. J. Med. Mushr. – 2002. – 4, N 3. – P. 245–254.
216. Bulseco M.G. Morphogenesis of *Schizophyllum commune*, a wild edible mushroom of Mt. Nagpale, Abucay, Bataan, Philippines / M. G. Bulseco, E. Abella, R. G. Reyes // J. Nature Studies. – 2005. – V. 4, N 1. – P. 20–28.
217. Burdyukova L.I. Fungal chitin in medicine: prospects for its application / L.I. Burdyukova, L.F. Gorovoj // Int. J. Med. Mushr. – 2001. – 3, N 2–3, P. 126–127.
218. Cabana H. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona* / H. Cabana, J.L.H. Jiwan, R. Rozenberg, V. Elisashvili, M. Penninckx // Chemosphere – 2007. – 67 (4), – P. 770-778.

219. Chang R. Functional properties of edible mushrooms Функціональні властивості їстівних грибів / R. Chang // Nutrition Rew. – 1996. – Vol. 54, – N 11. – P. 91–93.
220. Chang S.T. A 40–Year Journey Through Bioconversion of lignocellulosic wastes to mushrooms and dietary supplement 40–річний шлях на основі Біоконверсії лігноцелюлозних відходів з грибами і харчова добавка / S.T. Chang // Int. J. Med. Mushr. – 2001. – 3, N 4. – P. 299–310.
221. Chang S.T. Global impact of edible and medicinal Mushrooms on human welfare in the 21–st century: nongreen revolution / S. T. Chang // Intern. J. Med. Mushr. – 1999. – V. 1, N 1. – P. 1–7.
222. Chang S.T. Mushrooms. Cultivation, nutritional value, Medicinal effect and Environmental impact / S. T. Chang, Ph. G. Miles – London, N. Y., Washington: CRC Press, 2004. – 451 p.
223. Chang S.T. The role of culinary medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health / S. T. Chang, S. P. Wasser // Int. J. Med. Mushrooms. – 2012. – V.1, N 95. – P. 134.
224. Chang S.T. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) / S. T. Chang // Sing. in China. International J. of Med. Mushr. – 1999. – N. 1. – P. 291–300.
225. Chen W. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro / W. Chen, Z. Zhao, S–F. Chen, Y–Q. Li // Bioresour Technol. – 2008. – V. 99. – P. 3187–3194.
226. Cheung P. Dietary fiber content and composition of some cultivated edible mushrooms fruiting bodies and mycelia / P. Cheung // J. Agric. Food Chem. – 1996. – 44. – P. 468–471.
227. Chien Y.L. Effect of fermentation time on antioxidative activities of *Ganoderma lucidum* broth using leguminous plants as part of the liquid

- fermentation medium / Y.L.Chien, C.T.Ho, B.H.Chiang, L.S. Hwang // Food Chem. 2011;126: – P. 1586–1592.
228. Chihara G. Immunopharmacology of lentinan and glucans / G.Chihara // EOS J. Immunol. Immunopharm. – 1984. – Vol. 4. – P. 85–96.
229. Cohen R. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. / R.Cohen, L.Persky, Y. Hadar // Appl Microbiol Biotechnol. 2002;58: – P. 582–94.
230. Couto S.R. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi / S.R. Couto, J.L. Toca-Herrera // Biotechnol Adv. 2007;25: – P. 558–69.
231. Curvetto N. Sunflower seed-based medium for growth of *Ganoderma* spp. / N. Curvetto, R. Gonzalez-Matute, D. Figlas, S. Delmastro, J.E. Sanchez, G. Huerta, E. Montiel // Mushroom Biology and Mushroom Products – Cuernavaca, Mexico: UAEM, 2002. – 4. – P. 205–212.
232. Dai Yu-Ch. Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China (review) / Yu-Ch. Dai, Zh-L. Yang, B-K. Cui, Ch-J. Yu // Int. J. Med. Mushr. – 2009. – V. 11, N 3. – P. 287–302.
233. Davis J. Inactivation of antibiotic and the dissemination of resistance genes / J. Davis // Science. – 1994. – V. 264. – P. 375–382.
234. Davitashvili E. Evaluation of higher Basidiomycetes mushroom lectin activity in submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues / E. Davitashvili, E. Kapanadze, E. Kachlishvili [et al.] // Int. J. Med. Mushr. – 2008. – N. 10. – P. 173–178.
235. Davitashvili E. Lectin activity of genus *Cerrena* S.F. Gray (*Aphyllorphoromycetideae*) strains in submerged fermentation of lignocellulosic materials / E. Davitashvili, E.Kapanadze, E.Kachlishvili, V.Elisashvili. // Int J Med Mushr. – 2011. – 13. – P. 159–166.
236. Denisova N.P. Traditions of using medicinal mushrooms in different nations / N.P. Denisova // Int. J. Med. Mushr. – 2001. – 3, N 4. – P. 409–415.

237. Didukh M. Y. Medicinal value of species of the family *Agaricaceae* Cohn (higher Basidiomycetes) current stage of knowledge and future perspectives / M. Y. Didukh, S. P. Wasser, E. Nevo // Int. J. Med. Mushr. – 2003. – V. 5. – P. 133–152.
238. Didukh M.Ya. Impact of the family *Agaricaceae* on the nutrition and medicine / M.Ya. Didukh, S.P. Wasser, E. Nevo – Liechtenstein: A.R.A. Gantner Verlag K.G., Ruggell., 2004. – 205 p.
239. Donadio S. Targets and assays for discovering novel antibacterial agents / S. Donadio, L. Carrano, L. Brandi [et al.] // J. Biotechnol. – 2002. – V. 99. – P. 175–185.
240. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Droge // Physiological Reviews. – 2002. – V. 82. – P. 47–95.
241. Dubost N.J. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity / N.J. Dubost, B. Ou, R.B. Beelman // Food Chemistry. – 2007. – 105. N 2. – P. 727–735.
242. Dudka I.A. Mushrooms in folk medicine of the eastern slavs / I.A. Dudka // Int. J. Med. Mushr. – 2001. – 3, N 2–3. – P. 135.
243. Efremenkova O.V. Antimicrobial activity of medicinal mushrooms from the genus *Coprinus* (Fr.) S. F. Gray (Agaricomycetideae) / O. V. Efremenkova, E. Yu. Ershova, I. V. Tolstych [et al.] // Int. J. of Med. Mushr. – 2003. – V. 5. – P. 37–41.
244. Elisashvili V. Carbon and nitrogen source effects on Basidiomycetes exopolysaccharide production / V.Elisashvili, E.Kachlishvili, S.Wasser // Appl Biochem Microbiol. 2009;45: – P. 531–35.
245. Elisashvili V. Extracellular polysaccharide production by culinarymedicinal shiitake mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Singer and *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. species depending on carbon and nitrogen source / V.Elisashvili, S.Wasser, K.K.Tan, D.Chichua, E.Kachlishvili // Int J Med Mushr. 2004;6: – P. 165–72.

246. Elisashvili V. Lentinus edodes and Pleurotus species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition / V. Elisashvili, M. Penninckx, E. Kachlishvili, N. Tsiklauri, E. Metreveli // Bioresource technology. – 2008. –99 (3), – P. 457-462.
247. Elisashvili V. Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms: Bioprocesses and Products (Review) / V. Elisashvili // Int. J. Med. Mushr. – 2012. – V. 14, N 3. – P. 211–239.
248. Elmastas M. I. Antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *M. esculenta*) from North Turkey / M.I. Elmastas, L.O. Turkekul, O. Gulein // Com. Chem. High T. Scr. – 2006. – V. 9, N 6. – P. 443–448.
249. Eriksson K.–E. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components / K.–E. Eriksson, R.A. Blanchette, P. Ander – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1990. – 190 p.
250. Evaluation of certain food additives and contaminants (Thirty-third Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), WHO Technical, Report Series N 776. – Geneva. – 1989. – P. 64.
251. Evans R.J. Alternatives to syntetic antioxidants / R.J. Evans // Food. Ingredients. – Eur. Conf. Proc., Pfris. – 1991, Maarseen, 1991, p. 281–284.
252. Fadhel Z.A. Effects of black tea extract on carbon tetrachlorideinduced lipid peroxidation in liver, kidneys, and testes of rats. / Z.A.Fadhel, S. Amran // Phytother. Res. – 2002. – 16, – P. 28–32.
253. Fang Q.–H. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* / Q.–H. Fang, J.–J. Zhong // Process Biochemistry. – 2002. – 37. – P. 769–774.
254. Fang Q–H. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites ganoderic acid and polysaccharide. / Q–H.Fang, J–J. Zhong // Biochem Eng. 2002;10: – P. 61–65.

255. Fedotov O.V. Antioxidizing activity of mycelium of mushroom stocks *Pleurotus* (Fr.) Kumm. and *Flammulina* (Curt.: Fr.) Sing. / O.V. Fedotov // International journal of medicinal mushrooms. – 2001. – 3(2–3). – P. 143–144.
256. Fedotov O.V. Milk-clotting and antioxidant activity of enzyme preparations of fungi strains of the order Polyporales s.l. / O.V. Fedotov, A.K. Velygodska // The scientific heritage. Biological Sciences. – 2016. – V. 1. No 2(2). – P. 71–76.
257. Fedotov O.V. Search producers of polyphenols and some pigments among Basidiomycetes / O.V. Fedotov, A.K. Velygodska // Biotechnologia Acta. – V. 7, No 1, 2014. – P. 110–116.
258. Fedotov O.V. Wood-destroying fungi as bio-sources of ferments for medicinal and nutritional purposes / O.V. Fedotov // Plant and Microbial Enzymes: isolation, characterization and biotechnology applications (2–5th July, 2007, Tbilisi, Georgia). – Tbilisi: Myza, 2007. – P. 126–131.
259. Fedotov O.V. Mycelia antioxidantizing activity of the strains of genera *Pleurotus* (Fr.) Kumm. and *Flammulina* (Curt.: Fr.) Sing. / O.V. Fedotov, Y.U. Bugrim // The success of medical Mycology. – Vol. 3. – M.: National Academy of Mycology, 2003. – P. 252–254.
260. Fruehauf J.P. Reactive oxygen species: A breath of life or death? / J.P. Fruehauf, F.L. Jr. Meyskens // Clin. Cancer Res. – 2007. – 13(1), – P. 789–794.
261. Gao Y. Antibacterial and antiviral value of the genus *Ganoderma* P. Karst. species (*Aphyllorphoromycetideae*): a review / Y. Gao, S. Zhou, M. Huang, A. Xu // Int. J. Med. Mushr. – 2003. – 5, N 3. – P. 235–246.
262. Gill M. Pigments of Fungi (*Macromycetes*) / M. Gill, W. Steglich // Wien. – 1987. – Springer-Verlag. – 297 p.
263. Gontcharova I.A. Melanin pigments of medical mushrooms / I.A. Gontcharova, V.G. Babitskaya // Int. J. Med. Mushr. – 2001. – vol. 3. – № 2–3. – P. 148.

264. Grigat S. Probing the substrate specificity of the ergothioneine transporter with methimazole, hercynine, and organic cations / S. Grigat, S. Harlfinger, S. Pal, R. Striebinger, S. Golz, A. Geerts, A. Lazar, E. Schömig, D. Gründemann // *Biochemical pharmacology*. – 2007. N 4. – P. 309–316.
265. Grzywnowicz K. Medicinal Mushrooms in Polish Folk / K. Grzywnowicz // *Int. J. Med. Mushr.* – 2001. – 3, N 2–3. – P. 154.
266. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts / B. Halliwell // *The FASEB Journ.* 1987. – Vol. 1. – N 5. – P. 358–364.
267. Harvey P.I. Recent developments in the understanding of lignin biodegradation / P.I. Harvey // *J. Biol. Educ.* – 1986. – 20, № 3. – P. 169–174.
268. Hawker H. E. *Physiology of fungi* / H. E. Hawker – London: Univ. press, 1950. – 360 p.
269. Hawksworth D.L. Mushrooms: The extent of the unexplored potential / D.L. Hawksworth // *Int. J. Med. Mushr.* – 2001. – 3, N 4. – P. 333–340.
270. Hobbs Ch. *Medicinal mushrooms* / Ch. Hobbs. – Loveland: Interweave Press, 1996. – 252 p.
271. Hobbs Ch. Medicinal mushrooms: modern clinical uses overview / Ch. Hobbs // *Int. J. Med. Mushr.* – 2001. – 3, N 2–3. – P. 86.
272. Hölker U. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi / U.Hölker, M.Höfer, J.Lenz // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2004. – 64. – P. 175–186.
273. Iigusa H. Oxygen and hydrogen peroxide enhance light-induced carotenoid synthesis in *Neurospora crassa* / H. Iigusa, Y. Yoshida, K. Hasunuma // *FEBS Lett.* – 2005. – V. 579. – P. 4012–4016.
274. Ikekawa T. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms on health care / T. Ikekawa // *Int. J. Med. Mushr.* – 2001. – 3, N 4. – P. 291–298.

275. Ishikawa N. K. Antimicrobial cuparene-type sesquiterpenes, enokipodins C and D, from a mycelial culture of *Flammulina velutipes* / N. K. Ishikawa, Y. Fukushi, K. Yamaji [et al.] // J. Nat. Prod. – 2001. – V. 64, N. 7. – P. 932–934.
276. Isobe K. Production of catalase by fungi growing at low pH and high temperature / K. Isobe, N. Inoue, Y. Takamatsu [et al.] // J. Biosci. Bioeng. – 2006. – V. 101, N 1. – P. 73–76.
277. Jayakumar T. Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats / T. Jayakumar, P. A. Thomas, P. Geraldine // Exp. Gerontol. – 2007. – V. 42, N 3. – P. 183–191.
278. Jensen K.A. Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase / K.A. Jensen, W. Bao, S. Kawai, E. Srebotnik, K.E. Hammel // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – V. 62. – P. 3679–3686.
279. Jose N. Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of culinarymedicinal mushroom *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel (Agaricomycetidae) / N. Jose, T. A. Ajith, K. K. Jananrdhanan // Int. J. Med. Mush. – 2002. – V. 4. – P. 329–335.
280. Kachlishvili E. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation // E. Kachlishvili, M.J. Penninckx, N. Tsiklauri, V. Elisashvili // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2006. – 22 (4), – P. 391-397.
281. Kamra A. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* extracts against human pathogenic bacteria / A. Kamra, B. Bhatt // Int. J. Pharm. Pharmaceutic. Sci. – 2012. – V. 4, N 2. – P. 359–362.
282. Kao C. H. J. Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum*: active ingredients and pathways / C. H. J. Kao, A. C. Jesuthasan, K. S. Bishop [et al.] // Funct. Foods Health Disease. – 2013. – V. 3, N 2. – P. 48–65.



283. Kapich A.N. Conjugation of lipid peroxidation with degradation of lignin in wood-destroying Basidiomycetes. Microbial Biotechnology: fundamental and applied aspects: Trans. / A.N. Kapich. // Sc. Papers. – 2011. 3, – P. 316–335.
284. Kapich A.N. Oxidizability of unsaturated fatty acids and of a non-phenolic lignin structure in the manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation system. / A.N. Kapich. // Enzyme Microb. Technol. – 2010. 46(2), – P. 136–140.
285. Kapich A.N. Prooxidant activity in cultures of wood-decaying fungi / A. N. Kapich [et al.] // 9th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. – Durban: South Africa, 2004. – P. 33–34.
286. Kim H.W. Biomedicinal triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P.Karst (Aphyllphoromycetidae). / H.W.Kim, B.K. Kim // Int J Med Mushr. 1999;1: – P. 121–38.
287. Kirk P.M. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 9th ed. / P.M. Kirk, P.F. Cannon, J.C. David, J.A. Stalpers – Wallingford, CAB International, 2001. – 655 p.
288. Kirk T.K. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin / T.K. Kirk, R.L. Farrell // Annu. Rev. Microbiol. – 1987. – Vol. 41. – P. 465–505.
289. Lee B.C. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa* / B. C. Lee,
290. Lee W.Y. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum* / W.Y.Lee, Y.Park, J.K.Ahn, K.H.Ka, S.Y. Park // Enzyme Microb Technol. 2007;40: – P. 249–54.
291. Lee Y.H. Biological decolorization of reactive anthraquinone and phthalocyanine dyes under various oxidation-reduction conditions / Y.H.

- Lee, R.D. Matthews, S.G. Pavlostathis // Water Environ Res. 2006. - Vol. 78. - №. 2. - PP. 156-169.
292. Lelley J. Die Heilkraft der Pilze: Gesund durch Mykotherapie / J. Lelley. – Düsseldorf, München: ECON, 1997. – 236 p.
293. Lemieszek M. Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class / M. Lemieszek, W. Rzesk // Wspolczesna Onkol. – 2012. – V. 16, N 4. – P. 285–289.
294. Liang C.–H. Taste quality and antioxidant properties of medicinal mushroom *phellinus linteus* and *Sparassis crispa* mycelia / C.–H. Liang, S.–Y. Tsai, S.–J. Huang, Z.–C. Liang // Int. J. Med. Mushr. – 2010. – 12, N 2.– P. 141–150.
295. Lin C.M. // The Market of Edible Fungi, 2002. – 8. – P. 5.
296. Lin E–S. Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture / E–S.Lin, S.C. Sung // Int J Food Microbiol. –2006. – 108: – P. 182–187.
297. Lin E–S. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of *Grifola frondosa* TFRI1073 and their antioxidant and antiproliferative activities. / E–S.Lin // World J Microbiol Biotechnol. – 2011. – 27: – P. 555–561.
298. Lin E–S. Submerged culture medium composition for the antioxidant activity by *Grifola frondosa* TFRI1073. / E–S.Lin // Food Sci Biotechnol. 2010;19: – P. 917–922.
299. Lindequist U. The pharmacological potential of mushrooms / U. Lindequist, T. H. J. Niedermeyer, W. D. Julich // Evidence–based Compl. Alt. Medicine. 2008. – V. 2, N 3. – P. 285–299.
300. Lombardi G. Lesioning and recovery of the serotonergic projections to the hippocampus / G. Lombardi, O. Gandolfi, R. Dalldio, D. Pellegrini–Giampietro, M. Beni, O. Carla, A. Cansolazione, F. Maroni // Brain Res. – 1987. – 411, N 2. – P. 275–284.

301. Lorenzen K. Basidiomycetes as a source for new bioactive natural products / K. Lorenzen, T. Anke // *Current Organic Chemistry*. – 1998. – N 2. – P. 329–364.
302. Lung M. Y. Antioxidant property and production of exopolysaccharide from *Armillaria mellea* in submerged cultures: effect of culture aeration rate / M. Y. Lung, C. W. Hsieh // *Eng. Life Sci.* – 2011. – V. 11. – P. 482–490.
303. Maestro D.P. Actividad antioxidante de esteroides y acidos organicos naturales / D.P. Maestro, P.R. Borrja // *Grass y aceites*. – 1993. – T. 44, – N 3, – P. 208–212.
304. Maestro D.R. Actividad antioxidante de los compuestos fenolicos / D.R. Maestro, P.R. Bordja // *Grass y aceites*. – 1993. – T. 49, – N 2. – P. 101–106.
305. Malinowska E. Biosynthesis of selenium–containing polysaccharides with antioxidant activity in liquid culture of *Hericium erinaceum* / E.Malinowska, W. Krzyczkowski, F. Herold [et al.] // *Enzyme Microb. Technol.* – 2009. – V. 44. – P. 334–343.
306. Matsuzawa T. Studies on antioxidant effect of *Hypsizygus marmoreus*. I. Effects of *Hypsizygus marmoreus* for antioxidant activities of mice plasma / T. Matsuzawa, M. Sano, I. Tomita [et al.] // *Yakugaku-zasshi*. – 1997. – V. 117, N 9. – P. 623–628.
307. Matsuzawa T. Studies on antioxidant effect of *Hypsizygus marmoreus*. II. Effects of *Hypsizygus marmoreus* for antioxidant activities of tumor–bearing mice / T. Matsuzawa, M. Sano, I. Tomita // *Yakugaku-zasshi*. – 1998. – V. 118, N 10. – P. 476–481.
308. Mattila P. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms / P. Mattila, K. Könkö, M. Euroola [et al. ] // *J. Agric. Food Chem.* – 2001. – V. 49, N 5. – P. 2343–2348.

309. Mattila P.H. Vitamin D contents in edible mushrooms / P. H. Mattila, V. I. Piironen, E. J. Uusi-Rauva, P. E. Koivistoinen // J. Agric. Food Chem. 1994. – V. 42, N 11. – P. 2449–2453.
310. Mau J.–L. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia / J.–L. Mau, C. N. Chang, S. J. Huang // Food Chem. – 2004. – V. 87. – P. 111–118.
311. Mau J.–L. Antioxidant properties of several medicinal mushroom / J.–L. Mau, H.–C. Lin, C.–C. Chen // J.Agric. Food. Chem. – 2002. – 50, – N 21. – P. 6072–6077.
312. Mau J.N. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill. / J.N.Mau, S.Y.Tsai, Y.H.Tseng, S.J. Huang // LWT. 2005; 38: – P. 589–597.
313. Mieazawa M. Musizim: a new antioxidant, isolated from *Rumex japonicus* / M. Mieazawa, H. Kameoka // Chem. express. – 1991, – Vol. 6, – N 5, – P. 343–346.
314. Mikiashvili N. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity / N. Mikiashvili, S.P. Wasser, E. Nevo, V. Elisashvili // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2006. – 22 (9), – P. 999-1002.
315. Mizuno T. Food function and medicinal effect of mushroom fungi / T. Mizuno // Foods Food Ingredients J. of Jpn. – 1993. – N 158. – P. 55–70.
316. Mizuno T. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives / T. Mizuno // Int. J. Med. Mushr. – 1999. – 1, N 1.– P. 9–29.
317. Mizuno T. The exctraction and development of antitumor–active polysaccharides from medical mushrooms in Japan (Review) / T. Mizuno // Int. J. Med. Mushr. – 1999. – V. 1, N 1. – P. 9–29.
318. Moen M.A. Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in the basis for phenantrene oxidation by

- the intact fungus / M.A. Moen, K.E. Hammel // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol. 60. – P. 1956–1961.
319. Molitoris H.P. Mushrooms and man in medicine, myth, and religion / H.P. Molitoris // Int. J. Med. Mushr. – 2001. – 3. N 2–3. – P. 97.
320. Moore D. Fruit bodies: their production and development in relation to environment / D. Moore, A. C. Gange, E. G. Gange, L. Boddy // [eds. L. Boddy, J. C. Frankland, P. van West] – Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes. – Amsterdam. – 2008. – P. 79–103.
321. Morita Y. Purification, crystallization, and characterization of peroxidase from *Coprinus cinereus* / Y. Morita, H. Yamashita B. Mikami // J. Biochem. 1988. – V. 103, N 4. – P. 693–699.
322. Motoi M. Structure and antitumor activity of 1,3- $\beta$ -glucan from cultivated fruit bodies of culinary–medecinal mushroom *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigel. (*Agaricomycetideae*) / M. Motoi, S. Goto, N. Ohno // Int. J. Med. Mushr. – 2003. – 5, N 3. – P. 247–259.
323. Myoung–Jun J. Effect of LED light on primordium formation, morphological properties, ergosterol content and antioxidant activity of fruit body in *Pleurotus eryngii* / J. Myoung–Jun, L. Yun–hae, J. Young–Cheol // Korean J. Mycology. – 2011. – V. 39, N 8. – P. 175–179.
324. Nakatani N. A new antioxidative glucoside, isolated from oregano (*Origanum vulgare* L.) / N. Nakatani, H. Kikuzaki // Agr. and. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 51, – N 10, – P. 2727–2732.
325. Nakatani N. Antioxidants from plants / N. Nakatani // Protein, Nucl. Acid. and Enzyme. – 1993. – Vol. 38, – N. 11, – P. 132–143.
326. Ng T.B. Peptides and proteins from fungi / T.B. Ng // Peptides. – 2004. – 25. – P. 1055–1073.
327. Ohga S. Utilization of pulsed power to stimulate fructification of edible mushroom / S. Ohga, N. S. Cho, T. Li [et al.] // Mushroom Sci. – 2004. – V. 16. – P. 343–352.

328. Ooi V.E.C. Pharmacological studies on certain mushrooms from China / V.E.C. Ooi // Int. J. Med. Mushr. – 2001. – 3, N 4. – P. 341–354.
329. Ooi V.E.C. Review of Pharmacological Activities Of Mushroom Polysaccharides / V. E. Ooi, F. A. Liu // Int. J. Med. Mushr. – 1999. – V. 1, N 2. – P. 196–206.
330. Oyetayo V. O. Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Pleurotus ostreatus* (Jacq: Fries) Cultivated on Different Tropical Woody Substrates / V.O. Oyetayo, O.O. Ariyo // JWCBB.– 2013. – V. 1, N 2. – P. 28–32.
331. Patel S. Recent developments in mushrooms as anti–cancer therapeutics: a review / S. Patel, A. Goyal // Biotech. – 2012. – V. 2. – P. 1–15.
332. Pokorny R. Developmental changes in *Trichoderma viride* enzymes abundant in conidia and the light–induced conidiation signalling pathway / R. Pokorny, P. Vargovic, U. Holker [et al.] // J. Basic. Microbiol. – 2005. – V. 45, N 3. – P. 219–229.
333. Porras–Arboleda S.M. Mycelial submerged culture of new medicinal mushroom, *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey. (Aphyllorphomycetideae) for the production of valuable bioactive metabolites with cytotoxicity, genotoxicity, and antioxidant activity / S. M. Porras–Arboleda, N. A. Valdez–Cruz, B. Rojano [et al.] // Int. J. Med. Mushr. – 2009. – V. 11. – P. 335–350.
334. Potterat O. Antioxidants and free radical scavengers of natural origin / O. Potterat // Cur. Org. Chem. – 1997. – Vol. 1. – P. 415–440.
335. Poyedinok N.L. Effect of light wavelengths and coherence on growth, enzymes activity and melanin production of liquid cultured *Inonotus obliquus* (Ach.:Pers.) Pilát / N. Poyedinok, O. Mykchaylova, T. Tugay [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2015. – V. 176, N 2. – P. 333–343.
336. Poyedinok N.L. Effects of light wavelengths and coherence on basidiospores germination / N.L. Poyedinok, O.B. Mykhailova, A.M. Negriyko // J. Microbiol. Biotech. Food Sci. – 2015. – V. 4, N 4. – P. 352–357.

337. Poyedinok N.L. Induction of antimicrobial activity of some macromycetes by low-intensity light / N. L. Poyedinok, O.B. Mykchaylova, A.M. Negriyko [et al.] // *Biotechnologia Acta* – 2015. – V. 8, N 1. – P. 63–70.
338. Puchkova T. A. Physiology and properties of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing in submerged culture / T. A. Puchkova, V. G. Babitskaya, Z. A. Rozkova // *Int. J. Med. Mushr.* – 2001. – V. 3, N 2–3. – P. 206.
339. Puchkova T.A. Polysaccharides of medicinal caterpillar fungus, *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. (Ascomycetes): production and composition / T.A. Puchkova, V. G. Babitskaya, V. V. Shcherba [et al.] // *Int. J. Med. Mushr.* – 2010. – V. 12, N 4. – P. 419–425.
340. Quang D.N. Inedible mushrooms: a good source of biologically active substances / D.N.Quang, T.Hashimoto, Y.Asakawa // *Chem Rec.* 2006;6: – P. 79–99.
341. Quereshe S. Evaluation of antibacterial activity of different *Ganoderma lucidum* extracts / S. Quereshe, A. K. Pandey, S. S. Sandhu // *People's J. Sci. Res.* – 2010. – V. 3, N 1. – P. 10–13.
342. Radzki W. Antioxidant capacity and polyphenolic content of dried wild edible mushrooms from Poland / W. Radzki, A. Sławińska, E. Jabłońska-Ryś, W. Gustaw. // *Int. J. Med. Mushrooms.* – 2014. – 16(1). – P. 65–75.
343. Ramesh Ch. Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India / C. Ramesh, M. G. Pattar // *Pharmacognosy Res.* – 2010. – V. 2, N 2. – P. 107–112.
344. Ramkumar L.T. Antioxidant and radical scavenging activity of nine edible mushrooms extract / L.T. Ramkumar, P. Thirunavukkarasu, N. Arivuselvan // *Int. J.Pharmacol.* – 2010. – N 6. – P. 950–953.
345. Ranadive K. R. Glimpses of antimicrobial activity of fungi from World / K. R. Ranadive, M. H. Belsare, S. S. Deokule [et al.] // *J. New Biolog. Reports.* – 2013. – V. 2, N 2. – P. 142–162.

346. Ren L. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review / L. Ren, C. Perera Y. Hemar // Food Funct. – 2012. – N 11. – P. 1118–1130.
347. Reshetnikov S.V. Higher *Basidiomycetes* as a source of antitumour and immunostimulating polysaccharides (Review) / S.V. Reshetnikov, S.P. Wasser, K. R. Tan // Int. J. of Med. Mushr. – 2001. – V. 3, N 4. – P. 361–394.
348. Reshetnikov S.V. Medicinal value of the genus *Tremella* Pers. (*Heterobasidiomycetes*) (Review) / S.V. Reshetnikov, S.P. Wasser, E. Nevo, I. Duckman, K. Tsukor // Int. J. Med. Mushr. – 2000. – 2, N 3. – P. 169–193.
349. Reshetnikov S.V. Regulation of growth and biosynthetic activity of the medicinal jelly mushroom *Tremella mesenterica* Retz.: Fr. pure culture / S.V. Reshetnikov, S.P. Wasser, I. Duckman, K. Tsukor // Int. J. Med. Mushr. – 2001 a. – 3, N 1. – P. 45–51.
350. Rowan N. Immunomodulatory activities of mushrooms glucans and polysaccharide–protein complexes in animals and humans (review) / N. Rowan, J.E. Smith, R. Sullivan // Int. J. Med. Mushr. – 2003. – 5, N 2. – P. 95–110.
351. Ruis H. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defence / H. Ruis, F. Koller // Cold Spring Harbor. – N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. – P. 309–342.
352. Ryter S. W. Singlet Molecular Oxygen ( $1O_2$ ): A Possible effector of eukaryotic gene expression / S. W. Ryter, R. M. Tyrrell // Free Rad. Biol. Med. – 1998. – V. 24, N 9. – P. 1520–1534.
353. Saint-Cricq de Gaulejac N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods / N. Saint-Cricq de Gaulejac, C. Provost, N. Vivas // J. Agr. Food Chem. – 1999. – 47, N 2. – P. 425–431.
354. Saitoh H. Antitumor activity of *Hypsizigus marmoreus*. II. Preventive effect against Lung Metastasis of Lewis Lung Carcinoma / H. Saitoh, F.



- Weijian, T. Matsuzawa, T. Ikekawa // *Yakugaku-zasshi.* – 1997. – 117, N 12. – P. 1006–1010.
355. Scandalios J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses / J. G. Scandalios // *Brazilian J. Med. Biol. Res.* – 2005. – V. 38. – P. 995–1014.
356. Selvi S. Comparison of Non-Enzymic Antioxidant Status of fresh and Dried Form of *Pleurotus florida* and *Calocybe indica* / S. Selvi, P. Uma Devi, S. Suja [et al.] // *Pac. J. Nutr.* – 2007. – V. 6, N 5. – P. 468–471.
357. Selvi S. In vitro Antioxidant and Antilipidperoxidative potential of *Pleurotus florida* / S. Selvi, P. Chinnaswamy. // *Anc. Sci. Life.* – 2007. – 26(4). – P. 11–17.
358. Shi Y. Mushroom biology and mushroom products / Y. Shi, A. E. James, I. F. F. Benzie, J. A. Buswell. – Mexico, 2002. – 380 p.
359. Smith J.E. The role of polysaccharides derived from medicinal mushrooms in cancer treatment programs: current perspectives (Review) / J.E. Smith, R. Sullivan, N. Rowan // *Int. J. Med. Mushr.* – 2003. – 5, N 3. – P. 217–234.
360. Sohal R.S. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. / R.S. Sohal // *Free Radical Bio. Med.* – 2002. – 33(1), – P. 37–44.
361. Solomko E.F. Nutritional and medicinal benefits of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. submerged culture / E.F. Solomko // *Intern. J. Med. Mushrooms.* – 2001. – Vol. 3, – № 2–3. – P. 223.
362. Solomko E.F. Submerged culture of medicinal mushrooms / E.F. Solomko, A.S. Buchalo, M.L. Lomberg // *The XIV Congr. of Europ. Mycol.: abstracts (Yalta, 22–27 Sept., 2003)/* – Kiyv, 2003. – P. 106.
363. Solomko E.F. The selection of alternative substrates for medicinal mushroom cultivation / E.F. Solomko, M.L. Lomberg // *Intern. J. Med. Mushrooms.* – 2005. – Vol. 7, – № 3. – P. 466.

364. Song A. Effect of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  on *Agrocybe aegerita* in submerged culture with different pH / A. Song, T. Liu // Proceed. 2 Intern. Conference on Medicinal Mushrooms. – Peach, Pattaya, Thailand, 2003 a. – P. 539–544.
365. Song A. The selection on culture medium of *Agrocybe aegerita* / A. Song, T. Liu // Proceed. 2 Intern. Conference on Medicinal Mushrooms. – Peach, Pattaya, Thailand, 2003 b. – P. 535–538.
366. Song F.Q. Progress on understanding the anticancer mechanisms of medicinal mushroom: *Inonotus obliquus* / F. Q. Song, Y. Liu, X. S. Kong [et al.] // Asian. Pacific. J. Cancer Prev. – 2013. – V. 14, N 3. – P. 1571–1578.
367. Song T. Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture / T. Song, G.Yen // J Agricult Food Chem. 2002; 50: – P. 3322–3327.
368. Songulashvili G. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes // G. Songulashvili, V. Elisashvili, S.P. Wasser, E. Nevo, Y Hadar // Enzyme and Microbial Technology. – 2007. – 41 (1), – P. 57-61.
369. Songulashvili G. Laccase and manganese peroxidase activities of *Phellinus robustus* and *Ganoderma adspersum* grown on food industry wastes in submerged fermentation / G. Songulashvili, V. Elisashvili, S. Wasser, E. Nevo, Y. Hadar // Biotechnology letters. – 2006. – 28 (18), – P. 1425-1429.
370. Spengos K. Multifocal cerebral demyelination after magic mushroom abuse / K. Spengos, A. Schwarts, M. Hennerici // J. Neurology. – 2000. – 247, N 3. – P. 224–225.
371. Stahl W. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids / W. Stahl, H. Sies // Biochem. Biophys. Acta. – 2005. – V. 1740. – P. 101–107.
372. Stajic M. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species / M. Stajic, L.

- Persky, D. Friesem [et al.] // Enzyme Microb. Tech. – 2006. – V. 38. – P. 65–73.
373. Stamets P. Insights into the cultivation of Polyporaceae mushrooms: the ancient ones / P. Stamets // Int. J. Med. Mushr. – 2001. – 3, N 2–3. – P. 92.
374. Tang Y.–J. Fed–batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid / Y.–J. Tang, J.–J. Zhong // Enzyme and Microbial Technology. – 2002. – 31. – P. 20–28.
375. Tardif A. La Mycotherapie ou Les proprietes Medicinales des Champignons. – Paris. – 2000. – 167 p.
376. Thiyagarajan A. Optimizaton of extracellular peroxidase production from *Coprinus sp.* / A. Thiyagarajan, K. Saravanakumar, V. Kaviyarasan // Int. J. Sci. Tech. – 2008. – Vol. 1, N 7. – P. 1–5.
377. Thongchul N. Controlling filamentous fungal morphology by immobilization on a rotating fibrous matrix to enhance oxygen transfer and l(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. Ferment Biotechnol. / N.Thongchul, S.T. Yang // ACS Sym Ser. 2003;862: – P. 36–51
378. Toda S. Natural antioxidants. Antioxidative components, isolated from seeds of plantago asiatica / S. Toda, T. Myase, H. Arichi, H. Tanizawa, Y. Takio // Chem. and Pharm. Bull. – 1985, – Vol. 33, – N 3, – P. 1270–1273.
379. Tsai S. Antioxidant properties of hot water extracts from *Agrocybe cylindracea* / S.Tsai, S.Huang, J.Mau // Food Chem. 2006;98: – P. 670–677.
380. Turkoglu A. Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers / A. Turkoglu, I. Kivrak, N. Mercan // Afr. J. Biotechnol. – 2006. – V. 5, N 11. – P. 1146–1150.
381. Tyler V. Recent studies of the chemical constituents of the *Agaricales* / V. Tyler // Beitr. z. Bioch. Physiol. Naturstoff.– 1965. – Jena. – P.501–507.
382. Vaidya J. Fungi in folk medicine / J. Vaidya, A. Rabba // The Mycologist. – 1993. – N 3. – P. 131–133.

383. Valenzuela A. Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat / A. Valenzuela, C. Lagos, K. Schmidt, L. Videla // *Biochem. Pharmacol.* – 1985. – V. 34. – P. 2209–2212.
384. Valko M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2007. – 39(1), – P. 44–84.
385. Vamanu E. Studies on the antioxidant and antimicrobial activities of *Pleurotus ostreatus* PSI101109 mycelium / E. Vamanu // *Pakistan J. Botany.* – 2013. – V. 45, N 1. – P. 311–317.
386. Vekiari S.A. Isolation of natural antioxidants from Oregano / S.A. Vekiari, C. Tzia, V. Oreopoulou, C.D. Thomopoulos // *Riv. ital. sostanze grasse.* – 1993, – T. 70, – N 1, – P. 25–28.
387. Veligodska A.K. Screening of content and dynamic of accumulation of polyphenols in some Basidiomycetes species / A.K.Veligodska, O.V. Fedotov // *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University.* – No 3, 2015. – P. 42–54.
388. Veness R .G. The role of hydrogen peroxide in the degradation of crystalline cellulose by Basidiomycete fungi / R.G. Veness, C.S. Evans // *J. Gen. Microbiol.* – 1989. – V. 135. – P. 2799–2806.
389. Vesentini D. The protective role of the extracellular mucilaginous material (ECMM) from two wood–rotting Basidiomycetes against copper toxicity/ D.Vesentini, D.J.Dickinson, R.J. Murphy // *Int Biodet Biodegrad.* 2007;60: – P. 1–7.
390. Vollenweider F.X. 5-HT modulation of dopamine release in basal ganglia in psilocybin–induced psychosis in man – a PET study with [ $^{11}\text{C}$ ] raclopride / F.X. Vollenweider, P. Vontobel, D. Hell, K.L. Leenders // *Neuropsychopharmacology.* – 1999. – 20, N 5.– P. 424–433.

391. Voloshko T.E. Active producers of peroxidase Basidiomycetes strains screening / T.E.Voloshko, O.V.Fedotov // *Biotechnologia Acta.* – V. 6, No 5, 2013. – P. 137–142.
392. Voloshko T.E. Comparative characteristics of basidiomycetes – producers of catalase / T.E.Voloshko, O.V.Fedotov // *Biotechnologia Acta.* – V. 6, No 3, 2013. – P. 89–94.
393. Wang H. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* / H.Wang, J.Gao, T.B. Ng // *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;275: – P. 810–816.
394. Wang H. Investigation of antioxidants in extractives from Honeysuckle / H. Wang, E. Tang, A. Qiu // *Food and Ferment. Ind.* – 1988, – N 4, – P. 21–31.
395. Wang Y.C. Isolation and characterization of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* / Y.C. Wang, C.H. Wang, M.H. Shen, X.Y. Yan // *Mushroom biology and mushroom products* / Ed. D.J. Royse. – USA: Penn. State Univ., 1996. – 2. – P. 205–208.
396. Wasser S.P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms / S.P. Wasser // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2011. V. 89. – P. 1323–1332.
397. Wasser S.P. Medicinal mushroom science: current perspectives, advances, evidences, and challenges / S. P. Wasser // *Biomed. J.* – 2014. – V. 37, N 6. – P. 345–356.
398. Wasser S.P. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems / S. P. Wasser // *Int. J. Med. Mushr.* – 2010. – V. 12, N 1. – P. 1–16.
399. Wasser S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides / S.P. Wasser // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – 60. – P. 258–274.

400. Wasser S.P. Medicinal mushrooms: past, present and future / S.P. Wasser, K.M. Sytnik, A.S. Buchalo, E.F. Solomko // Укр. ботан. журн. – 2002 б. – 59, N 5. – P. 499–524.
401. Wasser S.P. The importance of culinary–medicinal mushrooms from ancient times to the present / S. P. Wasser // Int. J. of Med. Mushr. – 2005. – V. 7, N 3. – P. 263–264.
402. Watanabe T. Effects of exposure of concentrated Carbon Dioxide on chemical components of Bunashimeji mushroom (*Hypsizygus marmoreus* Bigelow) during growing of fruit body / T. Watanabe, A. Suzuki // Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 1995. – 42, N 9. – P. 656–660.
403. Watling R. The morphology, variation and ecological significance of anamorphs in the *Agaricales* / R. Watling // The Whole Fungus: Kananaskis 2 / Ed. B. Kendrick. – Ottawa, 1979. – 2. – P. 453–472.
404. Weis A.L. Cultural study and illudin S production of medicinal mushroom *Omphalotus olearius* (DC.: Fr.) Fay. (*Agaricales* s.l.) from Israel / A.L. Weis, E.F. Solomko, A.S. Buchalo, S.P. Wasser, N.Yu. Mitropolskaya, A.P. Gryganski, E.L. Gorovits // Int. J. Med. Mushr. – 1999. – 1, N 1. – P. 93–103.
405. Winqvist E. Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid–state cultivation of fungi / E. Winqvist, U. Moilanen, A. Mettala. // Biochem. Eng. J. – 2008. – V. 42. – P. 128–132.
406. Witting L.A. The oxidation of  $\alpha$ -tocopherol during the antioxidation of ethyl oleate, linoleate, linolenate and arachidonate / L.A. Witting // Arch. Biochem. and Biophys. – 1969, – Vol. 129, – N 1. – P. 142–151.
407. Wright A. Directly acting geno– and cytotoxic agents from a wild mushroom *Dermocybe sanguinea* / A. Wright, O. Raatikainen, H. Taipale // Mutation Res. – 1992. – 269, N 1. – P. 27–33.
408. Wu J.W. Elucidation of the chemical structure of natural antioxidants isolated from rosemary / J.W. Wu, M.–H. Lee, C.–T. Ho, S.S. Chang // J. Amer. Oil Chem. Soc. – 1982, – Vol. 59, – N 8, – P. 333–345.

409. Xu X. Comparative antioxidative characteristics of polysaccharide-enriched extracts from natural sclerotia and cultured mycelia in submerged fermentation of *Inonotus obliquus* / X. Xu, Y. Wu, H. Chen // Food Chem. – 2011. – V. 127. – P. 74–79.
410. Xu X. Enhanced phenolic antioxidants production in submerged cultures of *Inonotus obliquus* in a ground corn stover medium / X. Xu, J. Zhu // Biochem Engin J. – 2011. – 58–59. – P. 103–109.
411. Xu X. H. Bioactive proteins from mushrooms / X. H. Xu, H. Yan, J. Chen, X. Zhang // Biotechnol. Adv. – 2011. – V. 29, N 6. – P. 667–674.
412. Yang J. H. Antioxidant properties of commercial mushrooms / J. H. Yang, H. C. Lin, J. L. Mau // Food Chem. – 2002. – V. 77. – P. 229–235.
413. Yang Q.Y. Medicinal mushrooms in China / Q.Y. Yang, S.C. Jong // Mushroom Sci. / Eds. K. Grabbe, O. Hilber.– Braunschweig, Germany, 1989 b. – 12, Pt. I. – P. 631–643.
414. Yoon S. Production of polygalacturonase from *Ganoderma lucidum* / S. Yoon, M.–K. Kim, J.–S. Hong, M.–S. Kim // The Korean J. of Mycology. – 1994. – 22, N 4. – P. 286–297.
415. Young I.S. Antioxidants in health and disease / I.S. Young, J.V. Woodside // J.Clin. Pathol. – 2001. – Vol. 54. – N. 3. – P. 176–186.
416. Yu R. Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris* / R. Yu, W. Yang, L. Song [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2007. – V. 70, N 4. – P. 430–436.
417. Zang K.O. Antioxidative components of tanshen (*Salvia miltiorrhiza* Bung.). / K.O. Zang, Y. Bao, P. Wu, R.T. Rosen, G.–T. Ho // J. Agr. and Food. Chem. – 1990, – Vol. 38, – N 5, – P. 1194–1197.
418. Zhang B–B. A mechanistic study of the enhancing effect of Tween 80 on the mycelial growth and exopolysaccharide production by *Pleurotus tuber–regium* / B–B.Zhang, P.C.K. Cheung // Bioresour Technol. 2011;102: – P. 8323–8326.

419. Zheng W. NMR-based metabonomic analysis on effect of light on production of antioxidant phenolic compounds in submerged cultures of *Inonotus obliquus* / W. Zheng, M. Zhang, Y. Zhao [et al.] // Bioresource Technol. – 2009. – V. 100, N 19. – P. 4481–4487.
420. Zheng W. Production of antioxidant and antitumor metabolites by submerged cultures of *Inonotus obliquus* cocultured with *Phellinus punctatus* / W. Zheng, Y. Zhao, X. Zheng [et al.] // Appl. Microbiol. Biotech. – 2011. – V. 89, N 1. – P. 157–167.
421. Zheng W.F. Accumulation of antioxidant phenolic constituents in submerged cultures of *Inonotus obliquus* / W. F. Zheng, M. Zhang, Y. Zhao [et al.] // Bioresource Technol. – 2009. – V. 100, N 3. – P. 1327–1335.
422. Zheng W.F. Aminophenols and mold–water–extracts affect the accumulation of flavonoids and their antioxidant activity in cultured mycelia of *Inonotus obliquus* / W. F. Zheng, Q. Gu, C. F. Chen [et al.] // Mycosystema. – 2007. – V. 26, N 3. – P. 414–426.
423. Zhong J.J. Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. / J.J. Zhong, Y.J. Tang // Adv Biochem Eng Biotechnol. – 2004. N 87. – P. 25–59.
424. Zhou S. The immunomodulating effects of *Ganoderma lucidum* (Curt: Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi mushroom) (Aphyllophoromycetideae) / S. Zhou, Y. Gao // Int. J. Med. Mushr. – 2002. – 4, N 1. – P. 1–12.
425. Zong A. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research / A. Zong, H. Cao, F. Wanga // Carbohydr. Polym. – 2012. – V. 90, N 4. – P. 1395–1410.



## **ДОДАТОК А.**

**Рисунки, що ілюструють дані таблиць основного матеріалу**

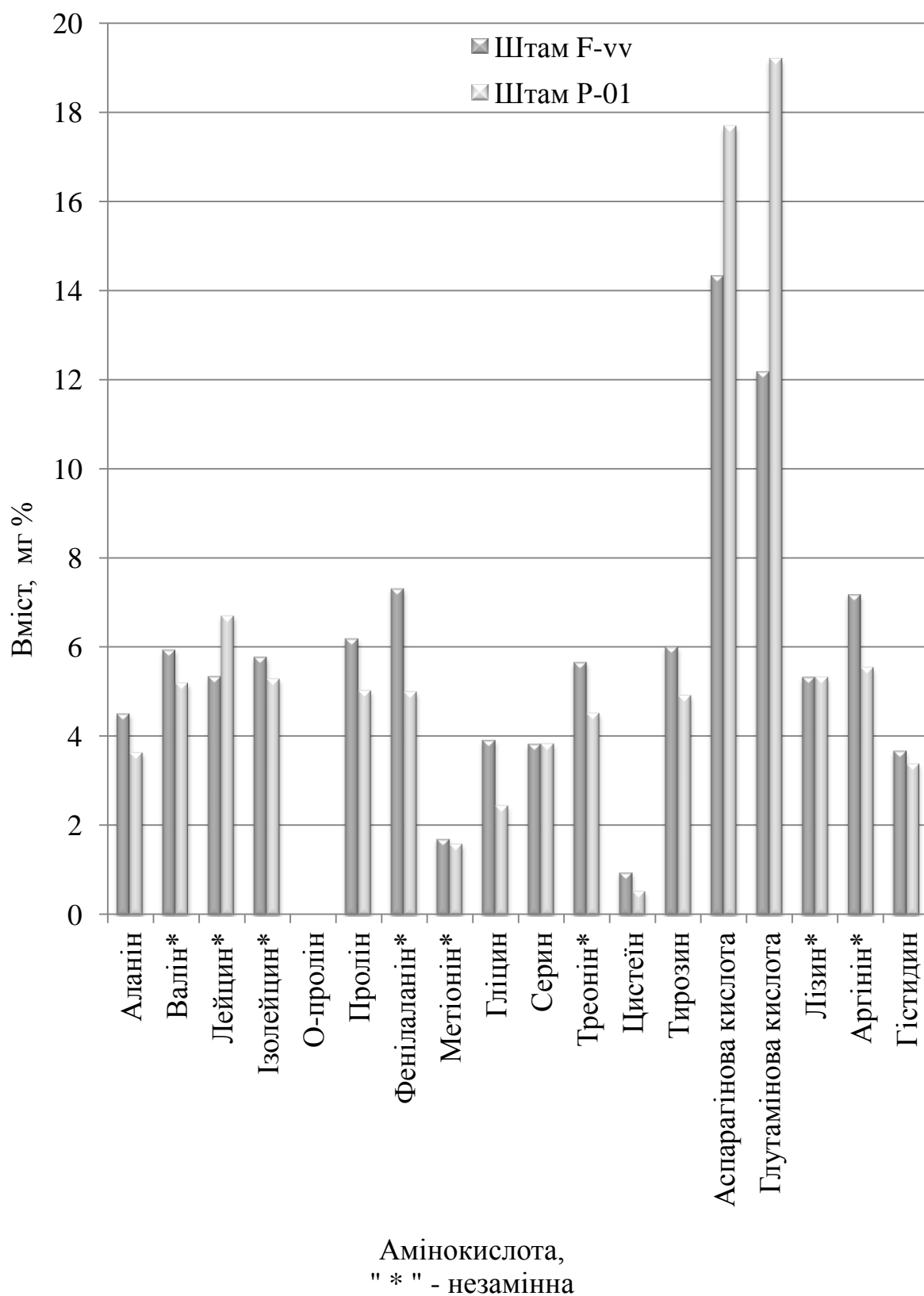


Рис. А.1. Амінокислотний склад ферментних препаратів міцеліальних каталаз штаму F–vv *Flammulina velutipes* і штаму P–01 *Pleurotus ostreatus*

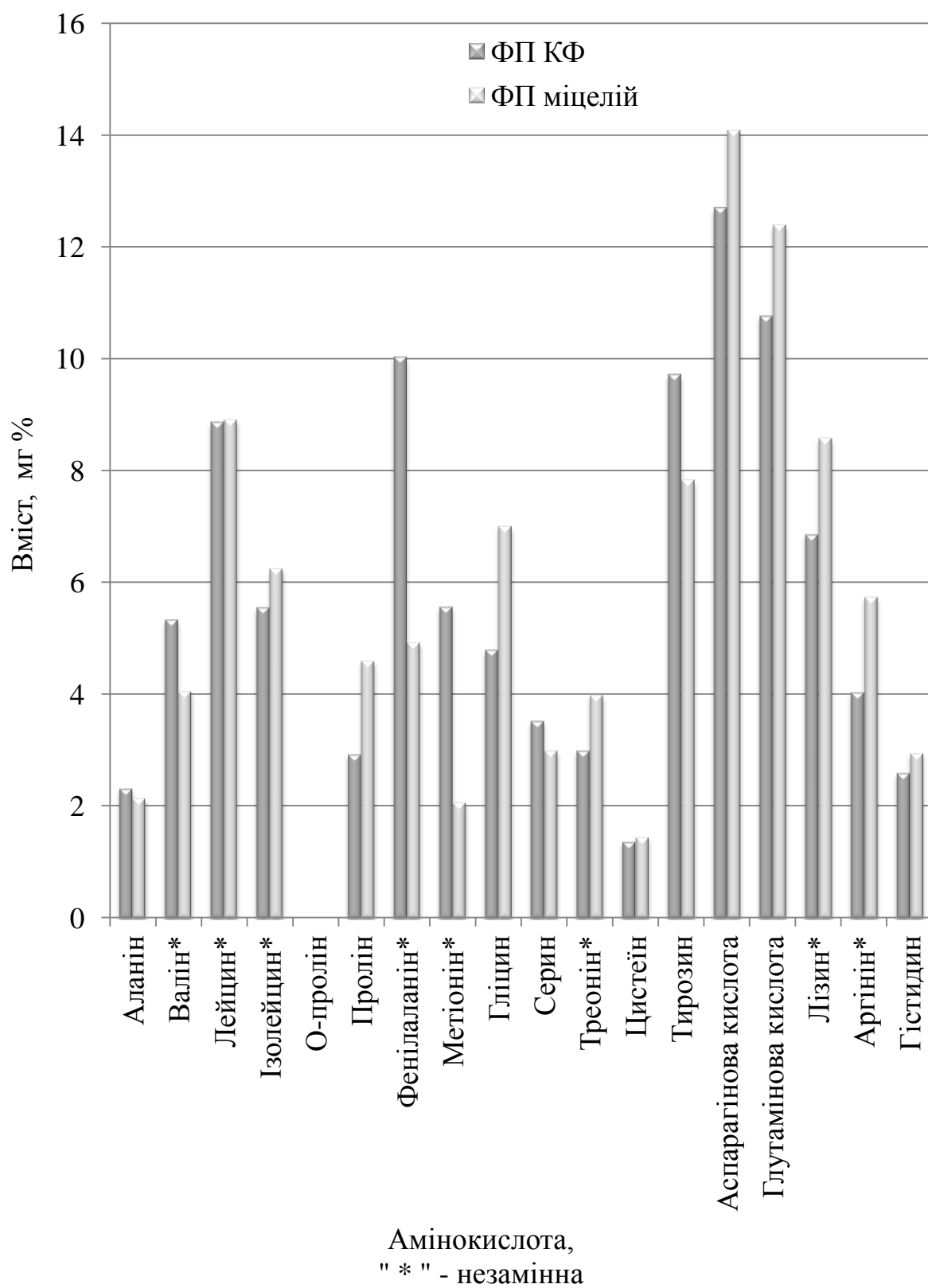


Рис. А.2. Амінокислотний склад ферментних препаратів пероксидаз штаму F-vv *Flammulina velutipes*

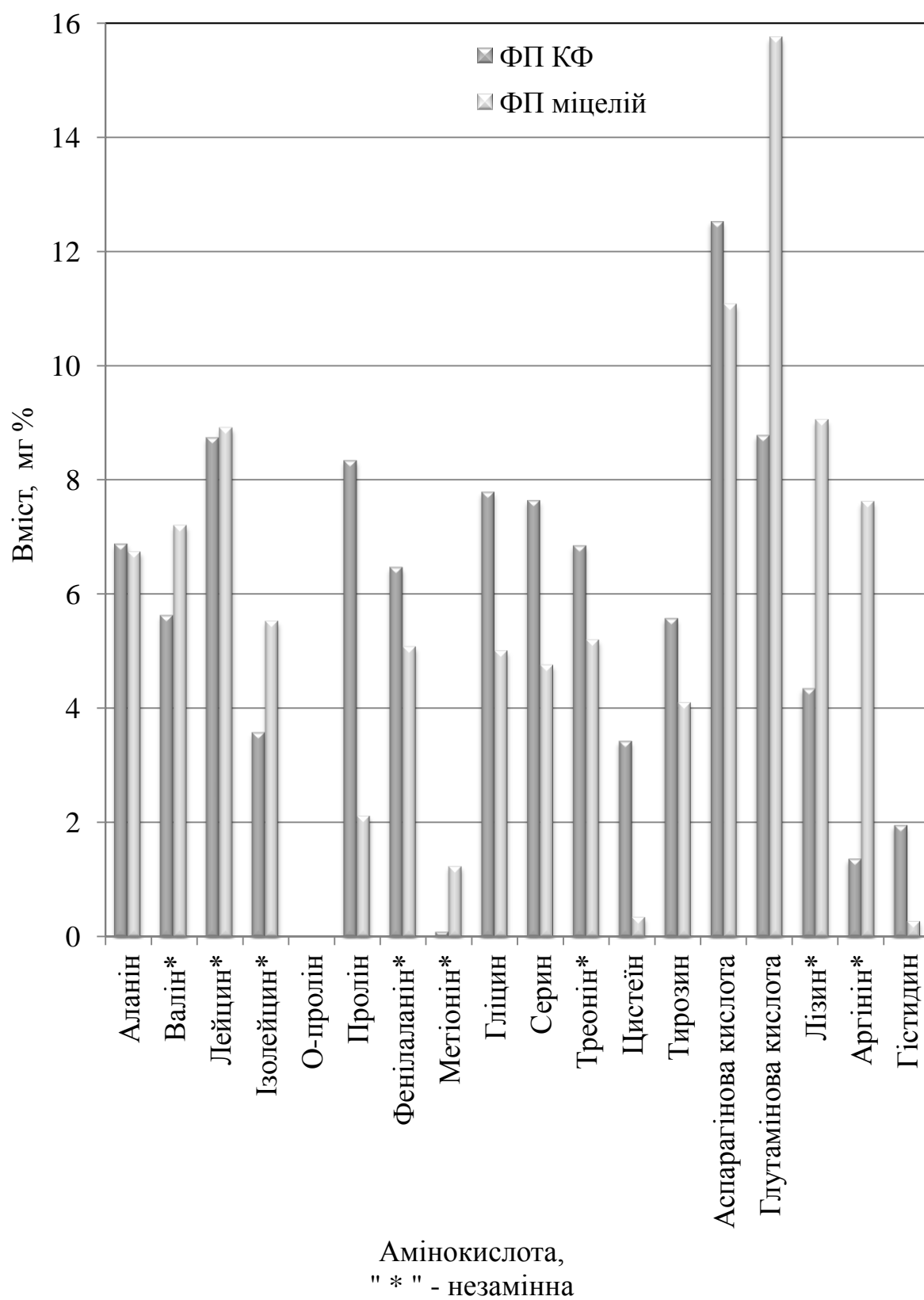


Рис. А.3. Амінокислотний склад ферментних препаратів пероксидаз штаму 523 *Lentinus edodes*

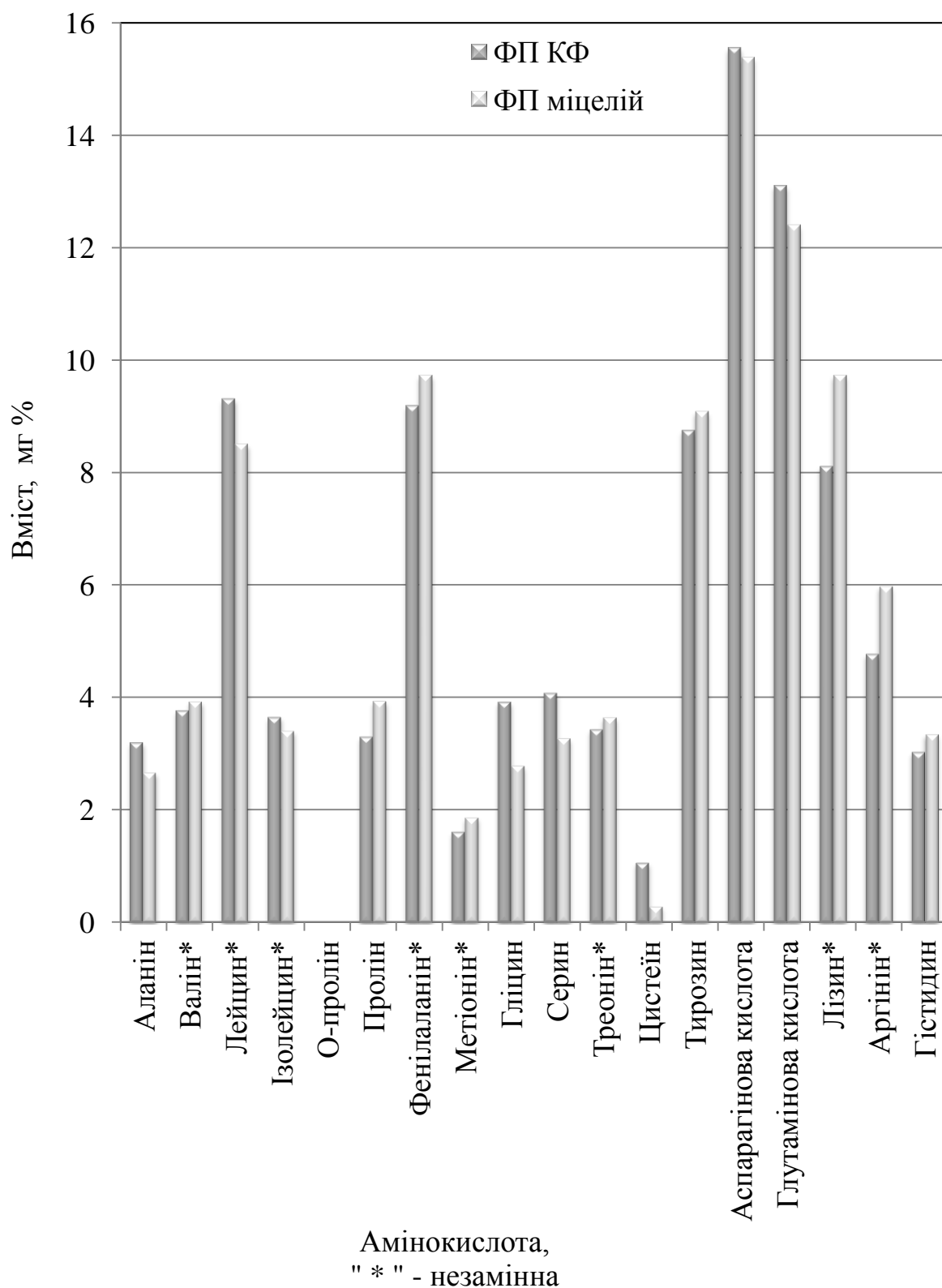


Рис. А.4. Амінокислотний склад ферментних препаратів пероксидаз штаму Р-01 *Pleurotus ostreatus*

## **ДОДАТОК Б.**

**Розробка лабораторної ферментаційної установки для культивування  
базидієвих грибів**



УКРАЇНА

(19) (UA)

(11) 40900 A

(51) 7 C12M1/04,  
C12M1/38МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І  
НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## Деклараційний патент на винахід

видано відповідно до Закону України  
"Про охорону прав на винаходи і корисні моделі"

Голова Державного Департаменту  
інтелектуальної власності



М. Паладій

(21) 2000105818

(22) 16.10.2000

(24) 15.08.2001

(46) 15.08.2001. Бюл. № 7

(72) Негруцький Сергій Федорович, Бойко Михайло Іванович, Федотов Олег  
Валерійович, Полях Віктор Олександрович

(73) ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(54) ЛАБОРАТОРНА ФЕРМЕНТАЦІЙНА УСТАНОВКА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ  
БАЗИДІОМІЦЕТІВ

Пат. на корисну модель 40900 А України. **Лабораторна ферментаційна установка для культивування базидіоміцетів** / Негруцький С.Ф., Бойко М.І., Федотов О.В., Полях В.О. Заявка № 2000105818, від 16.10.2000, кл. 7С12М1/04, С12М1/38, Бюл. № 7, від 15.08.2001.

Винахід відноситься до мікробіологічної промисловості, а саме до пристроїв для культивування соматичних структур базидіоміцетів. Лабораторна ферментаційна установка з біологічними реакторами “Біор-0,1” і “Біор-0,25” може бути використана для поверхневого і глибинного культивування вищих базидіоміцетів (макроміцетів, базидієвих грибів) – продуцентів біологічно активних речовин, в асептичних умовах напівпромислового експериментального виробництва для харчової, медичної і хімічної галузей промисловості.

Умовою розвитку біотехнології біологічно активних речовин є подальший пошук нових нетрадиційних біологічних об’єктів, що мають цінні виробничі властивості. Перспективним є використання вищих базидіоміцетів у мікробіологічній промисловості. Одним з важливих етапів розробки технології ферментації є експериментальні напівпромислові випробування штамів – продуцентів. Тому набуває актуальності питання монтажу досконалих лабораторних ферментаційних установок.

Відомий апарат для культивування мікроорганізмів, що складається з ферментатора і розміщених в ньому інокулятора та посівного приладу. Недоліком апарату є наявність великої кількості запірної арматури, устаткування для прокачування середовища, що значно збільшує ймовірність зараження культури мікроорганізму сторонньою мікрофлорою та інактивації продуцента. Апарат придатний до культивування лише одноклітинних мікроорганізмів, що не влаштовує вимоги до вирощування макроміцетів.

Запропонований спосіб культивування мікроорганізмів та апарат для його здійснення відрізняється вузькою спеціалізацією до живильного середовища (меляси) і продуценту. До недоліків апарату відноситься і



відсутність схеми підключення до допоміжних приладів та можливість його використання тільки в промислових умовах мікробіологічного виробництва (централізована подача стисненого повітря, пару). Апарат забезпечує недостатньо високий рівень асептичних умов культивування. Не регулюються процеси масообміну в ферментаційній камері.

Найбільш близьким за технічною суттю і досяжності результату є апарат для глибинного культивування мікроорганізмів, що має можливість регулювання інтенсивності масообмінних процесів в субстраті. Відмічається, що апарат має ємність з оболонкою обігріву, технологічні патрубки, кільцевий барботер, приводну мішалку, відбійники на опірних елементах. Не надається схема підключення ферментера до допоміжних приладів, що забезпечують стерилізацію апарату, середовища та режим культивування продуцента. Проте, способи розташування магістралей підключення та запірної арматури (в подальшому, магістралі підключення і запірна арматура називаються “обв’язка”) суттєво впливають на асептичні умови культивування. Апарат придатний до культивування лише одноклітинних мікроорганізмів, що не влаштовує вимоги до вирощування соматичних структур макроміцетів.

В основу винаходу поставлено завдання розробки і монтажу лабораторної ферментаційної установки для культивування базидіоміцетів, у якій за рахунок включення до неї біологічних реакторів (ферментерів), запропонованої обв’язки і її будови підвищуються функціональні можливості ферментерів в умовах лабораторії та покращуються асептичні показники як в апаратах, так і в системі магістралей і запірній апаратурі.

Поставлене завдання вирішується тим, що лабораторна ферментаційна установка для культивування базидіоміцетів містить біологічний реактор згідно винаходу, установка включає два біореактори (1, 2) підключених паралельно через обв’язку до автоклаву (3), компресору (4), термостатів (5, 6), водонагрівача (7), блоки автоматичного управління роботою мішалки (8, 9), блок автоматичного управління роботою компресора (10), датчик кисню

(11), що герметично вставний у біореактор, контактні термометри (12, 13), що регулюють роботу термостатів та обв'язку (14), яка містить вентилі, клапани, ротаметри, обернені клапани та бактеріальні повітряні фільтри з'єднані між собою магістралями.

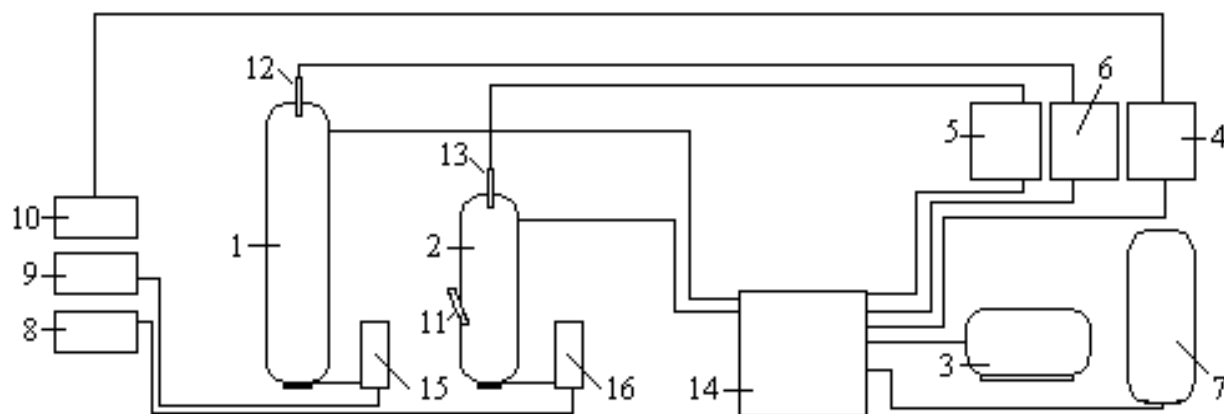


Рис. Б.1. Схема устрою лабораторної ферментаційної установки.

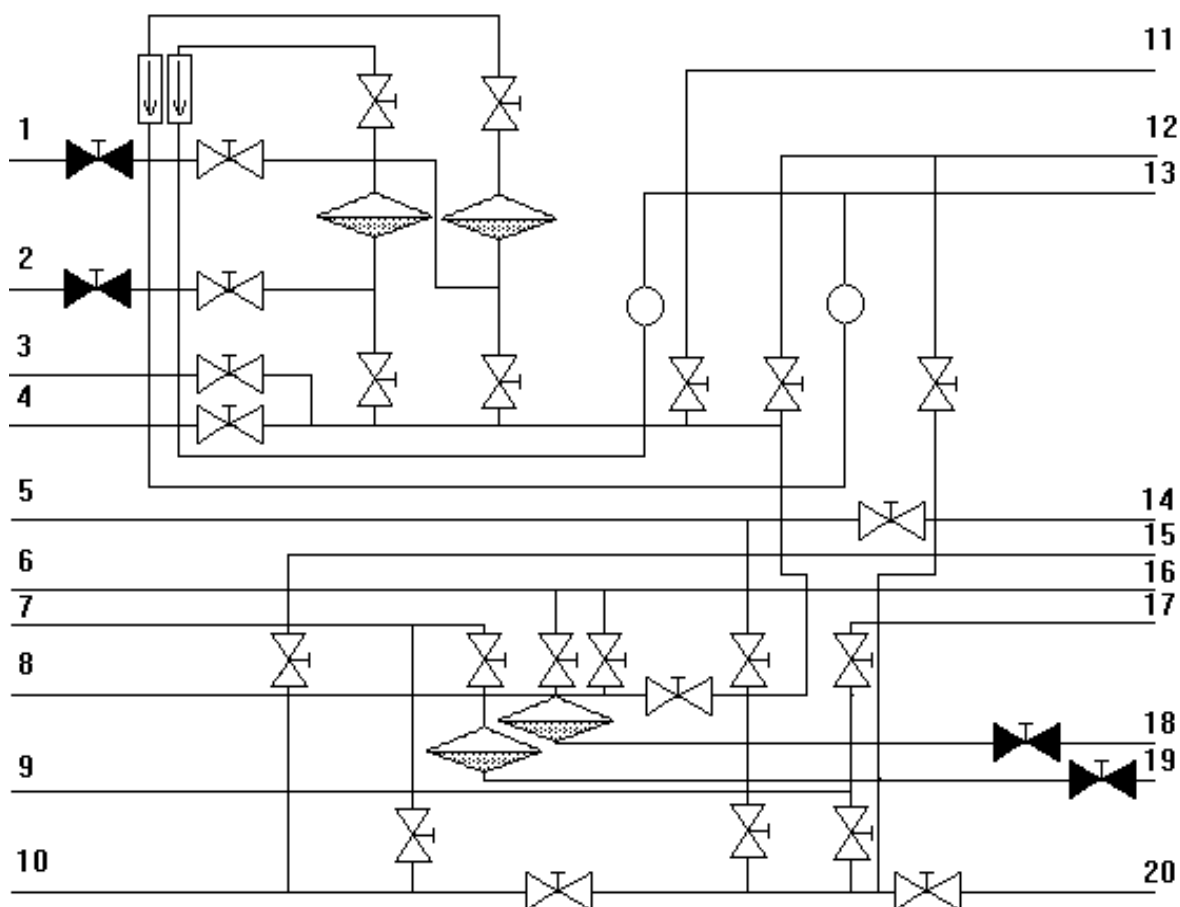



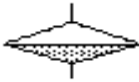




Рис. Б.2. схема устрою обв'язки лабораторної ферментаційної установки.

Таблиця Б.1

**Умовні позначення**

Позначення	Назва пристрою	Позначення	Назва пристрою
	ротаметр		регулюючий клапан
	обернений клапан		бактеріальний повітряний фільтр
	вентиль		магістраль

Таблиця Б.2

**Призначення магістралей**

№ магістралі	Призначення
13 – 1	повітря від компресору до “Біор–0,25”
13 – 2	повітря від компресору до “Біор–0,1”
11 – 3	пар від автоклаву до “Біор–0,1”
11 – 4	пар від автоклаву до “Біор–0,25”
15 – 5	теплоносій від термостату до оболонки “Біор–0,25”
6 – 18	скид газів і конденсату від “Біор–0,1”
7 – 19	скид газів і конденсату від “Біор–0,25”
8 – 16	теплоносій від оболонки “Біор–0,1” до термостату
17 – 9	теплоносій від термостату до оболонки “Біор–0,1”
10 – 14	теплоносій від оболонки “Біор–0,25” до термостату
12 – 9	вода від водонагрівача до оболонки “Біор–0,1”
12 – 5	вода від водонагрівача до оболонки “Біор–0,25”
20	скид конденсату від оболонок “Біор–0,1” і “Біор–0,25”, КФ

На рисунку Б.1. показано схему устрою лабораторної ферментаційної установки. Лабораторна ферментаційна установка складається з біологічних реакторів “Біор-0,1” і “Біор-0,25”, горизонтального автоклава “АГ-1”, компресора “УК25 – 1,6М”, термостатів “ТС –24А”, водонагрівача “ЕВАН – 100/1,25 И6”, блоку автоматичного управління роботою мішалки “БУЕП – 3”, блоку автоматичного управління роботою компресора,  $pO_2$  – метра, контактних термометрів та обв’язки. На рисунку Б.2. показано схему устрою обв’язки лабораторної ферментаційної установки. Обв’язка складається з магістралей, виконаних трубою  $\varnothing$  1,4 мм з харчової нержавіючої сталі, вентилів Рр 23 (Н-Д 22/2), клапанів 122–16 УХЛ 4 і ВД –125М, ротаметрів РМ – 0,63Г, обернених клапанів, бактеріальних повітряних фільтрів (табл. Б.1, Б.2).

Лабораторна ферментаційна установка працює таким чином.

1. Стерилізація біореакторів, магістралей і запірної арматури паром ( $t^\circ$  121 $^\circ$ C) від автоклава. Стерилізація біореактора “Біор-0,1” здійснюється по магістралі 11–3, а біореактора “Біор-0,25” – по магістралі 11–4. Скид газів і конденсату назовні від “Біор – 0,1” здійснюється по магістралі 6–18, а від “Біор – 0,25” здійснюється по магістралі 7–19.

2. Заповнення ємності ферментерів (–а) рідким живильним середовищем через вентилі АВ – 027 і АВ – 013М, розташовані на кришках “Біор – 0,1” і “Біор – 0,25” відповідно.

3. Стерилізація біореакторів і середовища паром ( $t^\circ$  121 $^\circ$ C) від автоклава. Стерилізація біореактора “Біор-0,1” з рідким живильним середовищем здійснюється по магістралі 11–3, а біореактора “Біор-0,25” – по магістралі 11–4. Скид конденсату назовні від “Біор-0,1” здійснюється по магістралі 6–18, а від “Біор – 0,25” здійснюється по магістралі 7–19; скид конденсату від оболонок ферментерів по магістралям 9–20 і 10–20 відповідно.

Етапи 1 і 3 стерилізації обладнання і середовища можуть бути поєднані. У цьому випадку, робота лабораторної ферментаційної установки

починається з заповнення ємності ферментера (–рів) живильним середовищем.

4. Інокуляція живильного середовища у біореакторах в асептичних умовах через вентилі АВ – 027 (“Біор-0,1”) або АВ – 013М (“Біор-0,25”) суспензією соматичних структур чистої культури макроміцета, наприклад ксилотрофу *Hirschioporus laricinus* (Karst.) Ryv.

5. Культивування продуцента біологічно активних речовин при оптимальних значеннях температури і аерації стерильним повітрям та перемішуванні субстрату. Теплоносій – дистильована вода подається до оболонок ферментерів “Біор-0,1” і “Біор-0,25” по магістралям 12–9, 12–5 відповідно. Оптимальна температура у ферментерах підтримується завдяки подачі теплоносія до оболонки “Біор-0,1” по магістралі 17–9 і у зворотному напрямку – по магістралі 8–16; до оболонки “Біор-0,25” по магістралі 15–5 і у зворотному напрямку – по магістралі 10–14. Повітря від компресору до біореактора “Біор-0,1” подається по магістралі 13–2, а до біореактора “Біор-0,25” – по магістралі 13–1.

6. Встановлення величини рН, вмісту кисню, температури, накопичення метаболіту (наприклад, молокозсідального ферменту) у середовищі під час ферментації. Відбір проб для визначення величин рН, ферментативної активності культурального фільтрату здійснюється через технологічний патрубок ферментера і вентиль, який знаходиться на ньому. Вміст кисню автоматично встановлюється датчиком рО<sub>2</sub>–метр (11). Температура живильного середовища фіксується контактними термометрами (12, 13), що регулюють роботу термостатів.

7. Злив середовища (культурального фільтрату) через технологічний патрубок ферментера і вентиль та магістраль 20; виділення метаболіту, наприклад, молокозсідального ферменту.

Після цього, цикл повторюється.

Система приладів та обладнання поєднана в лабораторну ферментаційну установку таким чином, що дозволяє проводити процес

культивування макроміцетів як синхронно, так і асинхронно в паралельно підключених ферментерах (біологічних реакторах).



Рис. Б.3. Лабораторна ферментаційна установка для культивування базидієвих грибів

Таким чином, запропонована лабораторна ферментаційна установка (рис. Б.3) має спрощену технологію монтажу, придатної до умов автономного експериментального виробництва та ферментації макроміцетів. Під час культивування продуцента є можливість фіксації і регулювання важливих умов і показників процесу. Використана нова схема монтажу обв'язки, що дозволяє підвищити асептичні умови культивування за рахунок можливості стерилізації паром всієї установки, забезпечує автономну, безпечну роботу лабораторної ферментаційної установки. Лабораторна установка придатна до поверхневого і глибинного вирощування штамів грибів порядку *Basidiomycetes* з різних систематичних груп – продуцентів біологічно активних речовин для харчової, медичної і хімічної галузей промисловості.

## ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

Лабораторна ферментаційна установка для культивування базидіоміцетів містить біологічний реактор, яка відрізняється тим, що, установка включає два біореактори, підключених паралельно через обв'язку до автоклаву, компресору, термостатів, водонагрівача, блоки автоматичного управління роботою мішалки, блок автоматичного управління роботою компресора, датчик кисню, що герметично вставлений у біореактор, контактні термометри, що регулюють роботу термостатів та обв'язку, яка містить вентиля, клапани, ротаметри, обернені клапани та бактеріальні повітряні фільтри з'єднані між собою магістралями.

Реферат

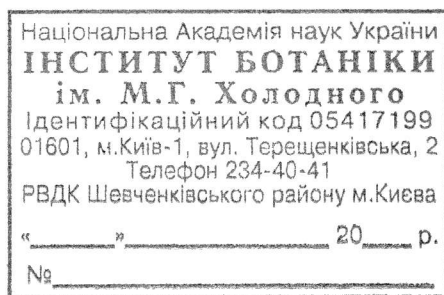
Лабораторна ферментаційна установка  
для культивування базидіоміцетів

Винахід відноситься до мікробіологічної промисловості, а саме до пристроїв для культивування соматичних структур базидіоміцетів. Лабораторна ферментаційна установка з біореакторами може бути використана для поверхневого і глибинного культивування базидіоміцетів (макроміцетів) – продуцентів біологічно активних речовин, зокрема ферментів, в асептичних умовах автономного напівпромислового експериментального виробництва для харчової, медичної і хімічної промисловостей. З метою підвищення функціональної можливості ферментерів та покращання асептичних показників як в апаратах, так і в системі магістралей і запірній арматурі, лабораторна ферментаційна установка містить два біореактори, підключених паралельно через обв'язку до автоклаву, компресору, термостатів, водонагрівача, блоки автоматичного управління роботою мішалки, блок автоматичного управління роботою компресора, датчик кисню, що герметично вставлений у біореактор, контактні термометри, що регулюють роботу термостатів та обв'язку, яка містить вентиля, клапани, ротаметри, обернені клапани та бактеріальні повітряні фільтри з'єднані між собою магістралями. 2 фіг., 2 табл.

**ДОДАТОК В.**

**Довідки про депонування чистих культур базидієвих грибів у  
Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки  
ім. М.Г. Холодного НАН України (ІВК)**





## СПРАВКА

Колекція культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України прийняла на зберігання 89 чистих культур 6 видів 3 родів *Basidiomycetes*, запропоновані кандидатом біологічних наук, старшим науковим співробітником, доцентом Донецького національного університету Федотовим Олегом Валерійовичем.

Керівник  
 Колекції культур шапинкових  
 грибів (ІВК)  
 д.б.н., проф.



А.С. Бухало



Підпис *Гусак А.С.*  
 Засвідчую  
 Відділ кадрів *Валерій*

## СПРАВКА

Специализированная коллекция культур Института ботаники им. Н.Г. Холодного АН Украины приняла на депонирование культуру макроскопического гриба *Tyromyces revolutus* (Bres.) Bond. et Sing., штамм BN-92 (A-025), предложенную коллективом авторов: Негруцкий Сергей Федорович, Федотов Олег Валерьевич, в качестве активного продуцента протеиназ.

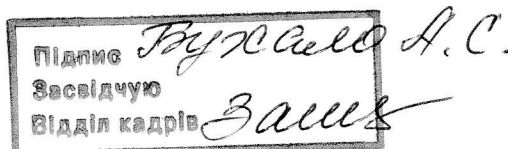
Принятая культура получила в коллекции номер 1025.

Отв. за коллекцию

доктор биологических наук



А.С.Бухало



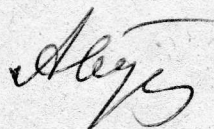
## СПРАВКА

Специализированная коллекция культур Института ботаники им. Н.Г. Холодного АН Украины приняла на депонирование культуру макроскопического гриба *Amylporia lenis* (Karst.) Bond. et Sing., штамм KB-92 (A-004), предложенную коллективом авторов: Негруцкий Сергей Федорович, Федотов Олег Валерьевич, Агужен Яна Геннадьевна, в качестве активного продуцента протеиназ.

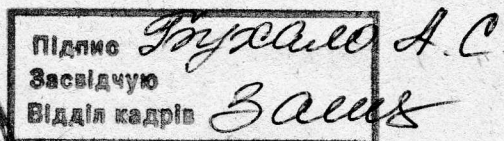
Принятая культура получила в коллекции номер 1026.

Отв. за коллекцию

доктор биологических наук



А.С.Бухало



ІНСТИТУТ БОТАНІКИ  
ім. М.Г. ХОЛОДНОГО  
НАН УКРАЇНИ



M.G. KHOLODNY INSTITUTE  
of BOTANY of the NATIONAL ACADEMY  
of SCIENCES of UKRAINE

Україна. 01601, м. Київ-1  
вул. Терещенківська, 2  
тел./факс: (044) 234-40-41  
E-mail: [inst@botany.kiev.ua](mailto:inst@botany.kiev.ua)

01601, Kyiv-1, Ukraine  
Tereschenkivska str., 2  
tel./fax: (380) 44 234-40-41  
E-mail: [inst@botany.kiev.ua](mailto:inst@botany.kiev.ua)

### СПРАВКА

Спеціалізована колекція культур Інститута ботаніки ім. Н.Г. Холодного АН України прийняла на депонування культуру макроскопічного гриба *Hirschioporus laricinus* (Karst.) Ryv., штамм А-032, предложенную колективом авторів: Негруцкий Сергей Федорович, Бойко Михаил Иванович, Федотов Олег Валерьевич, Никитина Ольга Александровна, в качестве активного продуцента протеиназ.

Прийнята культура получила в коллекции номер 1075.

Отв. за коллекцию

доктор биологических наук

*А.С. Бухало*

А.С. Бухало



Підпис *Бухало А.С.*  
Засвідчую  
Відділ кадрів *Залес*

**ДОДАТОК Г.****Акти про впровадження результатів дослідження у виробництво**





**УКРАЇНА**  
**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА**

вул. 600-річчя, 21, м. Вінниця, 21021  
 тел. приймальні: +38 (0432) 50-89-30, факс: +38 (0432) 50-87-78  
 E-mail: [rector@donnu.edu.ua](mailto:rector@donnu.edu.ua), код ЄДРПОУ 02070803

«07» 09 2017 № 303/61-09/61.13  
 На № \_\_\_\_\_ від \_\_\_\_\_

До спеціалізованої  
 вченої ради Д 26.002.28 при Національному  
 технічному університеті України  
 «Київський політехнічний інститут  
 імені Ігоря Сікорського» МОН України

**ДОВІДКА**

про впровадження результатів дисертаційної роботи

**Федотова Олега Валерійовича**

за темою «Біотехнологічні засади регулювання і використання прооксидантно-антиоксидантної активності базидієвих грибів», що подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Дисертаційну роботу виконано відповідно до тематики науково-дослідної роботи кафедри фізіології та біохімії рослин Донецького національного університету імені Василя Стуса Міністерства освіти і науки України (м. Вінниця) за держбюджетними темами: «Вивчення механізмів розвитку і біопродуктивності базидіальних грибів і на їх основі розроблення технології одержання ферментних препаратів, біопрепаратів і харчових продуктів» (1999-2001 рр.), № ДР 0100U001964; «Вивчення біопродуктивності базидіоміцетів і розроблення біотехнології одержання біопрепаратів та харчових продуктів» (2002-2004 рр.), № ДР 0103U003363; «Індукція протеїназ і селекція вищих базидіоміцетів для одержання біопрепаратів та харчових продуктів» (2005-2006 рр.), № ДР 0106U001946; «Розробка засобів біоіндикації екологічного стану Донбасу» (2006-2007 рр.); № ДР 0105U002768; «Діагностика екологічного стану середовища індустріального регіону за допомогою розробленої технології комплексної біоіндикації» (2007-2009 рр.), № ДР 0108U001589; «Визначення порогів чутливості біоіндикаторів на дію екологічно несприятливих факторів середовища» (2009-2011 рр.), № ДР 0110U003462; «Одержання ферментних препаратів, підвищення продуктивності базидіоміцетів за культивування на відходах в лабораторних та напівпромислових умовах» (2015-2016 рр.), № ДР 0115U000090; в межах яких вирішені актуальні проблеми суспільства – залучені нові об'єкти біотехнології до процесів отримання затребуваних біологічно активних речовин та способів біоконверсії і біоутилізації полютантів: створено наукові засади біотехнологічного використання прооксидантно-антиоксидантних властивостей базидієвих грибів, розроблені нові живильні середовища для культивування, запропоновані модифіковані технології виділення нових ферментних препаратів, встановлені основні біохімічні характеристики, виявлені штами-продуценти поліфенолів, каротеноїдів і меланіну.

Проректор з наукової роботи

І.В. Хаджинов



## Акционерное общество закрытого типа



## Донецкий городской молочный завод № 2

\* 83112, г. Донецк,  
Ленинский проспект, 69  
р/с №26000959677068 в филиале  
ПУМБ г. Донецка МФО 335537  
Код ОКПО 00445162

(0622) 63-26-22 - приемная  
(0622) 63-87-16 - сбыт  
(062) 385-54-11 - факс

e-mail: [Secretary@dgmz2.donetsk.ua](mailto:Secretary@dgmz2.donetsk.ua).

Исх. № 24571  
От «4» 10 2005 года

### АКТ про упрощения

АТЗТ «Донецким міським молокозаводом № 2» в период 1996-2003 рр. освоено в дослідному виробництві отримання експериментальної партії сиру типу «Здоров'я» з використанням нижченаведених патентів:

1. Патент 22915 А України. Живильне середовище для вирощування штаму М-81 *Hirschioporus laricinus* - продуцента молокозгортаючого ферменту / Бойко М.І., Негруцький С.Ф., Федотов О.В., Борисенко О.О. Заявка № 96031179, від 27. 03.96. кл. С 12N 1/38, Бюл. № 3, від 30.06.98.
2. Патент 25564 А України. Штам соматичних структур макроміцету *Hirschioporus laricinus* (Karst.) Ruv. А-032 - продуцент молокозсідального ферменту / Негруцький С.Ф., Бойко М.І., Федотов О.В., Нікітіна О.О. Заявка № 97073488, від 02. 07.97. кл. С 12N 1/38, С12N 9/14, Бюл. № 6, від 25.12.98.
3. Патент 40900 А України. Лабораторна ферментаційна установка для культивування базидіоміцетів / Негруцький С.Ф., Бойко М.І., Федотов О.В., Полях В.О. Заявка № 2000105818, від 16.10.00, кл. 7С12М1/04, С12М1/38, Бюл. № 7, від 15.08.01.

Голова правління  
АТЗТ «ММЗ №2» №2



М.П.

М.Л. Артем'єв

Затверджую:  
 Директор  
 ООО «УКРМИЦЕЛІЙ»  
 А.І. Тимофєєв  
 «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2009 р.



Затверджую:  
 Проректор ДонНУ  
 з наукової роботи  
 С.В. Беспалова  
 «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2009 р.



### АКТ про упровадження результатів

Ми, що підписалися нижче, представники Донецького національного університету:

1. Бойко М.І. – завідувач кафедри фізіології рослин ДонНУ, професор, доктор біологічних наук,
2. Ветрова О.В. – доцент, кандидат біологічних наук,
3. Демченко С.І. – доцент, кандидат біологічних наук,

і представники ООО «УКРМИЦЕЛІЙ»:

1. Тимофєєв Д.А – лаборант-міколог
2. Бандура І.І. – лаборант-технолог

Склали цей акт в тому, що результати науково-дослідної роботи «Вплив деяких фенольних речовин на каталазну активність штамів *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing.», виконаної студенткою V курсу біологічного факультету ДонНУ Євсєнковою Анною Миколаївною під науковим керівництвом к.б.н., с.н.с. доцента Федотова Олега Валерійовича упроваджено в виробничій лабораторії ООО «УКРМИЦЕЛІЙ».


Економічний ефект не обраховувався у зв'язку з необхідністю проведення додаткових досліджень. Результати роботи мають теоретичне і практичне значення для з'ясування перспектив використання штамів їстівних лікарських макроміцетів для отримання плодових тіл та біологічно активних речовин.

Представники ООО  
 «УКРМИЦЕЛІЙ»:

  
 Тимофєєв Д.А.  
 Тимофєєв Д.А.  
 Бандура І.І.  
 П.І.П.



Представники ДонНУ:

  
 Бойко М.І.  
 Ветрова О.В.  
 Демченко С.І.  
 П.І.П.



Затверджую:  
 Директор  
 ООО «УКРМІЦЕЛІЙ»  
 А.І. Тимофєєв  
 «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2009 р.



Затверджую:  
 Проректор ДонНУ  
 з наукової роботи  
 С.В. Беспалова  
 «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2009 р.



### АКТ про упровадження результатів

Ми, що підписалися нижче, представники Донецького національного університету:

1. Бойко М.І. – завідувач кафедри фізіології рослин ДонНУ, професор, доктор біологічних наук,
2. Ветрова О.В. – доцент, кандидат біологічних наук,
3. Демченко С.І. – доцент, кандидат біологічних наук,

і представники ООО «УКРМІЦЕЛІЙ»:

1. Тимофєєв Д.А – лаборант-міколог
2. Бандура І.І. – лаборант-технолог

склали цей акт в тому, що результати науково-дослідної роботи «Влияние условий культивирования на рост и каталазную активность штаммов *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm.», виконаної студенткою V курсу біологічного факультету ДонНУ *Брусніциною Ольгою Михайлівною* під науковим керівництвом к.б.н., с.н.с. доцента Федотова Олега Валерійовича упроваджено в виробничій лабораторії ООО «УКРМІЦЕЛІЙ».


Економічний ефект не обраховувався у зв'язку з необхідністю проведення додаткових досліджень. Результати роботи мають теоретичне і практичне значення для з'ясування перспектив використання штамів їстівних лікарських макроміцетів для отримання плодових тіл та біологічно активних речовин.

Представники ООО  
 «УКРМІЦЕЛІЙ»:

  
 Тимофєєв Д.А.  
 Бандура І.І.  
 П.І.П.



Представники ДонНУ:

  
 Ветрова О.В.  
 Демченко С.І.  
 П.І.П.

Затверджую:

Директор  
ООО «УКРМІЦЕЛІЙ»А.І. Тимофєєв  
2009 р.

Затверджую:

Проректор ДонНУ  
з наукової роботиС.В. Беспалова  
2009 р.

## АКТ

## про упровадження результатів

Ми, що підписалися нижче, представники Донецького національного університету:

1. Бойко М.І. – завідувач кафедри фізіології рослин ДонНУ, професор, доктор біологічних наук,
2. Ветрова О.В. – доцент, кандидат біологічних наук,
3. Демченко С.І. – доцент, кандидат біологічних наук,

і представники ООО «УКРМІЦЕЛІЙ»:

1. Тимофєєв Д.А – лаборант-міколог
2. Бандура І.І. – лаборант-технолог

склали цей акт в тому, що результати науково-дослідної роботи «**Индукция пероксидазной активности штаммов грибов *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. и *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler.**», виконаної студенткою V курсу біологічного факультету ДонНУ **Волошко Тетяною Євгенівною** під науковим керівництвом к.б.н., с.н.с. доцента Федотова Олега Валерійовича упроваджено в виробничій лабораторії ООО «УКРМІЦЕЛІЙ».

Економічний ефект не обраховувався у зв'язку з необхідністю проведення додаткових досліджень. Результати роботи мають теоретичне і практичне значення для з'ясування перспектив використання штамів їстівних лікарських макроміцетів для отримання плодових тіл та біологічно активних речовин.

Представники ООО  
«УКРМІЦЕЛІЙ»:

Підпис

Тимофєєв А.І.  
Тимофєєв Д.А.  
Бандура І.І.

П.І.П.

Представники ДонНУ:

Підпис

Бойко М.І.  
Ветрова О.В.  
Демченко С.І.

П.І.П.



Затверджую:

Директор

ТОВ "Біотехнологія"

 С.Б. Кравчук  
«29» березня 2011 р.


Затверджую:

Проректор ДонНУ

з наукової роботи

 С.В. Беспалова  
«  »    2011 р.


## АКТ

## про упровадження результатів

Ми, що підписалися нижче, представники Донецького національного університету:

1. Бойко М.І. – завідувач кафедри фізіології рослин ДонНУ, професор, доктор біологічних наук,
2. Ветрова О.В. – доцент, кандидат біологічних наук,
3. Демченко С.І. – доцент, кандидат біологічних наук,

і представники ТОВ "Біотехнологія":

1. Семків Т.В. – заступник директора,
2. Кобцева Л.Н. – завідувача виробництвом,


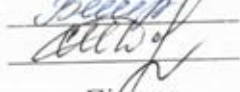
склали цей акт в тому, що результати науково-дослідної роботи «Меланіногенез лікарського гриба *Ganoderma applanatum* (Pers.: Wallr.) та використання результатів дослідження на уроках біології», виконаної студентом V курсу біологічного факультету ДонНУ **Поляковим Віталієм Сергійовичем** під науковим керівництвом доцента, к.б.н., с.н.с. Федотова Олега Валерійовича упроваджено в виробничих лабораторіях ТОВ "Біотехнологія".

Економічний ефект не обраховувався у зв'язку з необхідністю проведення додаткових досліджень. Результати роботи мають теоретичне і практичне значення для з'ясування перспектив використання штамів їстівних лікарських базидіоміцетів для отримання плодових тіл та біологічно активних речовин.

Представники  
ТОВ "Біотехнологія":

 Кобцева Л.Н.  
Семків Т.В.  
Підпис  П.І.П.


Представники  
ДонНУ:

 Бойко М.І.  
Ветрова О.В.  
Демченко С.І.  
Підпис  П.І.П.

Затверджую:

Директор

ТОВ "Біотехнологія"

 С.Б. Кравчук«29» Гереня 2011 р.

Затверджую:

Проректор ДонНУ

з наукової роботи

 С.В. Беспалова«29» Гереня 2011 р.

## АКТ

## про упровадження результатів

Ми, що підписалися нижче, представники Донецького національного університету:

1. Бойко М.І. – завідувач кафедри фізіології рослин ДонНУ, професор, доктор біологічних наук,
2. Ветрова О.В. – доцент, кандидат біологічних наук,
3. Демченко С.І. – доцент, кандидат біологічних наук,

і представники ТОВ "Біотехнологія":

1. Семків Т.В. – заступник директора,
2. Кобцева Л.Н. – завідувача виробництвом,


склали цей акт в тому, що результати дипломної роботи «Вивчення синтезу каротиноїдів базидіоміцетом *Fistulina hepatica* (Schaeff.) Sibth.», виконаної студенткою V курсу біологічного факультету ДонНУ Селемєнєвою Катериною Іллівною під науковим керівництвом доцента, к.б.н., с.н.с. Федотова Олега Валерійовича упроваджено в виробничих лабораторіях ТОВ "Біотехнологія".

Економічний ефект не обраховувався у зв'язку з необхідністю проведення додаткових досліджень. Результати роботи мають теоретичне і практичне значення для з'ясування перспектив використання штамів їстівних лікарських базидіоміцетів для отримання плодових тіл та біологічно активних речовин.

Представники  
ТОВ "Біотехнологія": Кобцева Л.Н.

Підпис

П.І.Б.

Представники  
ДонНУ: Бойко М.І.

Підпис

П.І.Б.

**ДОДАТОК Д.**

**Лист про присвоєння грифу МОН монографії у вигляді навчального  
посібника “Лікарські речовини рослин і грибів”**

Бєспаловей С.В.  
5.02.07. Др



## МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

01135, м.Київ, проспект Перемоги, 10  
Тел.(044) 486 24 42, факс (044) 236 10 49  
[vvv@minosvit.niit.kiev.ua](mailto:vvv@minosvit.niit.kiev.ua)

24.01.07 № 1.4/18-Г-168  
на № \_\_\_\_\_ від \_\_\_\_\_

Проректорові Донецького  
національного  
університету

Христіанівському В.В.

На Ваше прохання Міністерство освіти і науки розглянуло рукопис О.В. Федотова "Лікарські речовини рослин і грибів", провело незалежну експертизу та ухвалює його до видання з грифом "Рекомендовано Міністерством освіти і науки України як навчальний посібник для студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів".

Видання буде здійснено за кошти навчального закладу.

На звороті титульної сторінки необхідно вказати, коли і ким надано гриф.

Контрольні примірники книги просимо надіслати до Інституту інноваційних технологій і змісту освіти за адресою: 04070, м. Київ, вул. Сагайдачного, 37, кімн. 222.

Заступник міністра

М.Ф.Степко

Сатрапінська Л.Л.,  
417-81-86



## **ДОДАТОК Е.**

**Висновки атестованих і ліцензованих лабораторій  
експертизи та дослідження токсичності грибних ферментних препаратів**



лечебно - диагностический центр



**Биотическая  
Медицина**

лицензия МОЗ с АВ № 049631 от 09.03.2006  
83045, Украина, г.Донецк, пр-т Ленинский, 47а  
тел.: +380 62 387 51 73 факс.: +380 62 387 51 74

[www.biomed.dn.ua](http://www.biomed.dn.ua)

Проведено дослідження токсичності ферментних препаратів, отриманих зі штаму базидіоміцети *Flammulina velutipes* F-vv.

За показниками безпеки ферментні препарати відповідають наступним вимогам:

Вміст токсичних елементів: свинець	не перевищує 10,0 мг/кг
арсен	не перевищує 3,0 мг/кг
Кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів (КМАФАнМ)	не перевищує $5 \times 10^4$ КУО/г
Бактерії групи кишкових паличок (БГКП, коліформи)	відсутні
Патогенні мікроорганізми, в т.ч.: сальмонели	відсутні
E.coli	відсутні
Життєздатні форми продуценту ферментів	відсутні
Антибіотична активність	відсутня
Мікотоксини	відсутні

При одноразовому введенні білим мишам у шлунок в дозі 5000 мг/кг і внутрішньочеревно в дозі 950 мг/кг загальний стан тварин був задовільним, поведінка активною, апетит не змінювався. Протягом 30 діб після введення ФП ні загибелі, ні інших ознак інтоксикації не спостерігалось.

Таким чином, ферментні препарати, отримані зі штаму базидіоміцети *Flammulina velutipes* F-vv, можна віднести до малонебезпечних ферментних препаратів (4 клас небезпеки).

зав.токсикологической  
лабораторией





лечебно - диагностический центр



**Биотическая  
Медицина**

лицензия МОЗ с АВ № 049631 от 09.03.2006  
83045, Украина, г.Донецк, пр-т Ленинский, 47а  
тел.: +380 62 387 51 73 факс.: +380 62 387 51 74

[www.biomed.dn.ua](http://www.biomed.dn.ua)

Проведено дослідження токсичності ферментних препаратів, отриманих зі штаму базидіоміцети *Pleurotus ostreatus* P-01.

За показниками безпеки ферментні препарати відповідають наступним вимогам:

Вміст токсичних елементів: свинець	не перевищує 10,0 мг/кг
арсен	не перевищує 3,0 мг/кг
Кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів (КМАФАнМ)	не перевищує $5 \times 10^4$ КУО/г
Бактерії групи кишкових паличок (БГКП, коліформи)	відсутні
Патогенні мікроорганізми, в т.ч.: сальмонели	відсутні
E.coli	відсутні
Життєздатні форми продуценту ферментів	відсутні
Антибіотична активність	відсутня
Мікотоксини	відсутні

При одноразовому введенні білим мишам у шлунок в дозі 5000 мг/кг і внутрішньочеревно в дозі 950 мг/кг загальний стан тварин був задовільним, поведінка активною, апетит не змінювався. Протягом 30 діб після введення ФП ні загибелі, ні інших ознак інтоксикації не спостерігалось.

Таким чином, ферментні препарати, отримані зі штаму базидіоміцету *Pleurotus ostreatus* P-01, можна віднести до малонебезпечних ферментних препаратів (4 клас небезпеки).

зав.токсикологической  
лабораторией



лечебно - диагностический центр



**Биотическая  
Медицина**

лицензия МОЗ с АВ № 049631 от 09.03.2006  
83045, Украина, г.Донецк, пр-т Ленинский, 47а  
тел.: +380 62 387 51 73 факс.: +380 62 387 51 74

[www.biomed.dn.ua](http://www.biomed.dn.ua)

Проведено дослідження токсичності ферментних препаратів, отриманих зі штаму базидіоміцети *Fistulina hepatica* Fh-08.

За показниками безпеки ферментні препарати відповідають наступним вимогам:

Вміст токсичних елементів: свинець	не перевищує 10,0 мг/кг
арсен	не перевищує 3,0 мг/кг
Кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів (КМАФАнМ)	не перевищує $5 \times 10^4$ КУО/г
Бактерії групи кишкових паличок (БГКП, коліформи)	відсутні
Патогенні мікроорганізми, в т.ч.: сальмонели	відсутні
E.coli	відсутні
Життєздатні форми продуценту ферментів	відсутні
Антибіотична активність	відсутня
Мікотоксини	відсутні

При одноразовому введенні білим мишам у шлунок в дозі 5000 мг/кг і внутрішньочеревно в дозі 950 мг/кг загальний стан тварин був задовільним, поведінка активною, апетит не змінювався. Протягом 30 діб після введення ФП ні загибелі, ні інших ознак інтоксикації не спостерігалось.

Таким чином, ферментні препарати, отримані зі штаму базидіоміцети *Fistulina hepatica* Fh-08, можна віднести до малонебезпечних ферментних препаратів (4 клас безпеки).

зав.токсикологической  
лабораторией



лечебно - диагностический центр



**Биотическая  
Медицина**

лицензия МОЗ с АВ № 049631 от 09.03.2006  
83045, Украина, г. Донецк, пр-т Ленинский, 47а  
тел.: +380 62 387 51 73 факс.: +380 62 387 51 74

www.biomed.dn.ua

Проведено дослідження токсичності ферментних препаратів, отриманих зі штаму базидіоміцети *Lentinus edodes* 523.

За показниками безпеки ферментні препарати відповідають наступним вимогам:

Вміст токсичних елементів: свинець	не перевищує 10,0 мг/кг
арсен	не перевищує 3,0 мг/кг
Кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів (КМАФАнМ)	не перевищує $5 \times 10^4$ КУО/г
Бактерії групи кишкових паличок (БГКП, колиформи)	відсутні
Патогенні мікроорганізми, в т.ч.: сальмонели	відсутні
E.coli	відсутні
Життєздатні форми продуценту ферментів	відсутні
Антибіотична активність	відсутня
Мікотоксини	відсутні

При одноразовому введенні білим мишам у шлунок в дозі 5000 мг/кг і внутрішньочеревно в дозі 950 мг/кг загальний стан тварин був задовільним, поведінка активною, апетит не змінювався. Протягом 30 діб після введення ФП ні загибелі, ні інших ознак інтоксикації не спостерігалось.

Таким чином, ферментні препарати, отримані зі штаму базидіоміцету *Lentinus edodes* 523, можна віднести до малонебезпечних ферментних препаратів (4 клас небезпеки).

зав.токсикологической  
лабораторией



М.А. Шуркан



**Лабораторія ФХА і КВ**

тел. (06453)7-33-00  
свідчення про атестацію № РБ 260/2010, діє до  
листопада 2013



**ТОВ НВФ  
МІКРОХІМ**

**ЕКСПЕРТИЗА  
ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ ШТАМІВ БАЗИДИОМІЦЕТІВ  
FLAMMULINA VELUTIPES F-vv та PLEUROTUS OSTREATUS P-01**

Замовники: Федотов Олег Валерійович – доцент, к.б.н., с.н.с. ДонНУ  
Волошко Тетяна Євгенівна – студент ДонНУ

Проби ферментних препаратів (ФП) надійшли у пробірках типу *Eppendorf* 2,0 мл у кількості 12 шт., з яких:

- № 1-3 – є ферментним препаратом екзоклітинного походження шт. *Flammulina velutipes* F-vv,
- № 4-6 – є ферментним препаратом ендоклітинного походження шт. *Flammulina velutipes* F-vv,
- № 7-9 – є ферментним препаратом екзоклітинного походження шт. *Pleurotus ostreatus* P-01
- № 10-12 – є ферментним препаратом ендоклітинного походження шт. *Pleurotus ostreatus* P-01.

Дата надходження проб ферментних препаратів  
Виробник – ФП отримано в наукових лабораторіях  
Донецького національного університету (ДонНУ)

Визначення каталазної активності ФП проводилось за загальноприйнятими методами: спектрофотометрично, за здатністю пероксиду водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс.

Ферментативна активність наданих зразків ФП

Номер зразка ФП	Каталазна активність, мкат/мг	Номер зразка ФП	Каталазна активність, мкат/мг
1	4112,8	7	9700,2
2	4000,7	8	9850,0
3	4120,2	9	9230,4
4	1280,5	10	1420,0
5	1280,5	11	1500,0
6	1400,6	12	1560,8

«13» травня 2013 р

Начальник лабораторії ФХА і КВ



**Лабораторія ФХА і КВ**

тел. (06453)7-33-00  
свідчення про атестацію № РБ 260/2010, діє до  
листопада 2013



**ТОВ НВФ  
МІКРОХІМ**

**ЕКСПЕРТИЗА  
ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ ШТАМІВ БАЗИДИОМІЦЕТІВ  
*LENTINUS EDODES 523, FLAMMULINA VELUTIPES F-vv* та  
*PLEUROTUS OSTREATUS P-01***

Замовники: Федотов Олег Валерійович – доцент, к.б.н., с.н.с. ДонНУ  
Волошко Тетяна Євгенівна – студент ДонНУ

Проби ферментних препаратів (ФП) надійшли у пробірках типу *Eppendorf* 2,0 мл у кількості 18 шт., з яких:

- № 1-3 – є ферментним препаратом екзоклітинного походження шт. *Lentinus edodes 523*,
- № 4-6 – є ферментним препаратом ендоклітинного походження шт. *Lentinus edodes 523*,
- № 7-9 – є ферментним препаратом екзоклітинного походження шт. *Flammulina velutipes F-vv*,
- № 10-12 – є ферментним препаратом ендоклітинного походження шт. *Flammulina velutipes F-vv*,
- № 13-15 – є ферментним препаратом екзоклітинного походження шт. *Pleurotus ostreatus P-01*
- № 16-18 – є ферментним препаратом ендоклітинного походження шт. *Pleurotus ostreatus P-01*.

Дата надходження проб ферментних препаратів  
Виробник – ФП отримано в наукових лабораторіях  
Донецького національного університету (ДонНУ)

Визначення пероксидазної активності ФП проводилось за загальноприйнятими методами: активність ФП оцінювали спектрофотометрично за відношенням до АВТС.  
Ферментативна активність наданих зразків ФП:

Номер зразка ФП	Пероксидазна активність, Е/мг	Номер зразка ФП	Пероксидазна активність, Е/мг
1	4,4	10	8,9
2	4,7	11	9,2
3	4,3	12	9,2
4	4,6	13	3,4
5	4,1	14	3,5
6	4,7	15	3,4
7	4,8	16	3,2
8	4,8	17	3,2
9	4,7		3,3

«13» травня 2013 р  
Начальник лабораторії ФХА і КВ



Логінова Г.О.